

**Untersuchungen zur Synthese und biologischen Aktivität von
neuen Inhibitoren NAD⁺-abhängiger Enzyme aus Paullonen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Anja Christine Becker
aus Berlin-Zehlendorf

1. Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
eingereicht am:	22.04.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.06.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Becker, A., Kohfeld, S., Pies, T., Wieking, K., Preu, L., Kunick, C.: Synthesis of 11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acids by cascade autoxidation-ring contractions, *Synthesis* **2009**, 1185-1189.

Tagungsbeiträge

Becker, A., Kohfeld, S., Preu, L., Pies, T., Zaharevitz, D.W. and Kunick, C.: Paullones are rearranged to 11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acids by a novel ring contraction reaction. (Poster) 234th ACS National Meeting, Boston, MA, USA (2007).

Becker, A., Kohfeld, S., Preu, L., Pies, T., Zaharevitz, D.W. und Kunick, C.: 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren aus Paullonen: Eine neue Ringverengungsreaktion. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Erlangen (2007).

Becker, A. Kohfeld, S., Lader, A., Schemies, J., Jung, M., Kunick, C.: *N*-Benzyl-paullones as novel inhibitors of mitochondrial malate dehydrogenase and human sirtuins. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Bonn (2008).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2006 bis April 2009 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, seine engagierte Betreuung und Unterstützung und für die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis sehr herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Koreferats.

Meinem Opa Günter in liebevoller Erinnerung gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Citratzyklus.....	1
1.2	Die Malatdehydrogenase	4
1.2.1	Malat-Aspartat-Shuttle	5
1.2.2	Struktur der Malatdehydrogenase.....	6
1.2.3	Die Malatdehydrogenase als Target und ihre Inhibitoren	8
1.2.4	Testsysteme für potentielle MDH-Inhibitoren	14
1.3	Histondesacetylasen	15
1.3.1	Histondesacetylasen der Klassen I, II und IV und deren Inhibitoren.....	17
1.3.2	Sirtuine	18
1.3.3	Inhibitoren der Sirtuine.....	20
2	Ziel der Arbeit	25
3	Synthesen	29
3.1	Synthese der 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dione	29
3.2	Darstellung von Indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepinonen durch Fischer-Indol-Synthese	32
3.3	Synthese der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-one	34
3.3.1	Besonderheiten in den NMR-Spektren der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-one.....	37
3.4	Ringverengung von Paullonen	40
3.4.1	Oxidationen mit <i>N</i> -Hydroxybenzotriazol und anderen Oxidationsmitteln	42
3.4.2	Oxidationen mit <i>N</i> -Hydroxyphthalimid.....	46
3.4.3	Kombination von <i>N</i> -Hydroxyphthalimid mit Metallsalzen als Cokatalysatoren.....	49

3.4.4	Weitere Methodenentwicklung für die gezielte Synthese von 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren.....	52
3.4.5	Isolierung der 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren aus den Reaktionsgemischen	59
3.5	Mechanismus der Ringverengung von Indolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepinonen zu 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren	60
3.5.1	Analytische Untersuchungen zu Nebenprodukten der Ringverengung	66
3.6	Decarboxylierung von 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren.....	71
3.7	<i>N,N'</i> -Bis-(11 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren)	72
3.7.1	Spektroskopische Untersuchungen der Oxidationsprodukte von 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren	74
3.8	Darstellung von substituierten Chinolinen, Chinaldinen und Chinolin-2-carbonsäuren	76
3.9	Darstellung von 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolinen durch Palladium-induzierten Ringschluss.....	80
4	Biologische Aktivität.....	82
4.1	Malatdehydrogenase-inhibitorische Aktivität	82
4.1.1	Testsystem und Messprinzip	82
4.1.2	Inhibitorische Aktivität der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]-benzazepin-6(5 <i>H</i>)-one	87
4.1.3	Inhibitorische Aktivität der 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren.....	92
4.1.4	Inhibitorische Aktivität kommerziell verfügbarer Chinolincarbonsäuren.....	95
4.1.5	Inhibitorische Aktivität der Anilinochinolinderivate	97
4.1.6	Untersuchungen zur Reaktionskinetik	100
4.2	Inhibitorische Aktivität gegenüber Sirtuinen	105

4.2.1	Inhibitorische Aktivität der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]-benzazepin-6(5 <i>H</i>)-one	109
4.2.2	Inhibitorische Aktivität der 11 <i>H</i> -Indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäuren.....	110
4.3	Proteinkinase-inhibitorische Aktivität.....	112
4.4	In vitro Antitumoraktivität.....	113
5	Zusammenfassung	116
6	Summary.....	119
7	Experimenteller Teil	122
7.1	Allgemeines	122
7.2	Synthesen und analytische Daten.....	126
7.3	Biologische Daten	197
7.3.1	Malatdehydrogenase-Testung	197
7.3.2	Testung auf Inhibition humaner Sirtuine	204
7.3.3	Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität	206
7.3.4	In Vitro Tumorzelllinien-Screening des National Cancer Institutes	209
8	Literaturverzeichnis	213

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AIBN	Azobisisobutyronitril
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDE	<i>bond dissociation energy</i>
ber.	berechnet
BSA	bovines Serumalbumin
BTNO	Benzotriazol- <i>N</i> -oxyl-Radikal
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
C _i	Cubitus interruptus
cMDH	zytosolische Malatdehydrogenase
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DAD	<i>diode array detector</i>
DBPO	Dibenzoylperoxid
DC	Dünnschichtchromatogramm
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol

EI	Elektronenstoß-Ionisation
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXO	<i>Forkhead box type O proteins</i>
gef.	gefunden
GI ₅₀	<i>growth inhibition 50 per cent</i>
GS	Glykogen Synthase
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondesacetylase
H ₂ O	Wasser
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50 per cent</i>
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KBr	Kaliumbromid
K _i	Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
λ _{max}	Absorptionsmaximum
LDH	Lactatdehydrogenase
Lit.	Literatur
log ₁₀	dekadischer Logarithmus

Abkürzungsverzeichnis

m	Multiplett
[M] ⁺	Molekülradikalkation
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mMDH	mitochondriale Malatdehydrogenase
M	Molare Masse
m/z	Masse pro Ladungseinheit
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NHPI	<i>N</i> -Hydroxyphthalimid
NHSI	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
p53	Tumorsuppressorprotein 53
pIC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus des IC ₅₀ -Wertes
PINO	Phthalimid- <i>N</i> -oxyl-Radikal
PKC	Protein Kinase C
ppm	<i>parts per million</i>
%ig	prozentig
q	Quartett
quart.	quartär
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAR	<i>structure activity relationship</i>
SIRT	humanes Sirtuin
Schmp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
tert.	tertiär
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl

Abkürzungsverzeichnis

THF	Tetrahydrofuran
t_m	Totzeit
t_{m+s}	Gesamtretentionszeit
TMS	Tetramethylsilan
t_s	Nettoretentionszeit
TSA	Trichostatin A
UV	Ultra-Violett
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z. T.	zum Teil
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten selektive und potente Inhibitoren der mitochondrialen Malatdehydrogenase (mMDH) synthetisiert und an dem Enzym auf ihr inhibitorisches Potential getestet werden. Die mMDH ist ein zentrales Enzym im Citratzyklus, der im Folgenden näher erläutert wird.

1.1 Der Citratzyklus

Der Citratzyklus ist ein zyklischer Stoffwechselweg der mitochondrialen Matrix, der das Zentrum zahlreicher metabolischer Sequenzen darstellt und daher oft als "Drehscheibe des Stoffwechsels" beschrieben wird (Abbildung 1-1). In einem Reaktionszyklus wird ein Acetyl-Rest (aus Acetyl-CoA) unter Energiegewinnung zu zwei Molekülen CO_2 oxidiert. Die dabei gewonnenen Reduktionsäquivalente in Form von NADH/H^+ und FADH_2 werden in der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen. Bei dieser Reaktionsfolge wird Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) frei. Sir Hans Adolf Krebs, der den Citratzyklus im Jahre 1937 postulierte, wurde für seine Entdeckung im Jahre 1953 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.¹⁻³ Oft wird dieser zentrale Stoffwechselweg daher auch als "Krebs-Zyklus" bezeichnet.

Formal lässt sich der Citratzyklus in zwei Teilabschnitte gliedern: Im ersten Abschnitt wird Acetyl-CoA auf Oxalacetat unter Bildung von Citrat übertragen und in vier weiteren Schritten zu Succinat abgebaut, wobei zwei Moleküle CO_2 frei werden, die von der Zelle abgeatmet werden. Im zweiten Abschnitt wird aus Succinat wieder Oxalacetat regeneriert, das nun einem erneuten Kreislauf zur Verfügung gestellt wird.

Das im ersten Schritt auf Oxalacetat übertragene Acetyl-CoA stammt aus verschiedenen katabolen Stoffwechselwegen des Organismus. Die Abbaupfade aller Kohlenhydrate vereinigen sich letztendlich in der Glykolyse und führen zu deren Endprodukt, dem Pyruvat. Pyruvat wird durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex) durch dehydrierende Decarboxylierung in Acetyl-CoA überführt und so dem Citratzyklus zugeführt. Fettsäuren werden sukzessive oxidativ in einem Reaktionszyklus (β -Oxidation) verstoffwechselt und setzen pro Zyklus ein Molekül

Acetyl-CoA frei. Auch der Abbau einiger Aminosäuren liefert Acetyl-CoA für den Citratzyklus. Bei der Verstoffwechselung eines Moleküls Acetyl-CoA entstehen an verschiedenen Stellen des Citratzyklus, nämlich bei der Bildung von α -Ketoglutarat, der darauffolgenden Oxidation zu Succinyl-CoA und der Bildung von Oxalacetat aus Malat drei Moleküle NADH/H^+ . Die Entstehung von Fumarat aus Succinat liefert ein Molekül FADH_2 . In einem Reaktionszyklus entstehen also acht Reduktionsäquivalente, die der Atmungskette direkt zur Verfügung gestellt werden. Die in diesen Reduktionsäquivalenten gespeicherte Energie wird im Verlauf der oxidativen Phosphorylierung in eine chemisch völlig andere Energieform überführt, indem die Redoxenergie zunächst in Form eines Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran zwischengespeichert wird. Dieser Gradient wird durch die verschiedenen Komplexe der Atmungskette (I-IV) aufgebaut, die als Protonenpumpen fungieren (Komplexe I, III und IV). Die für die Pumpen benötigte Energie entstammt den Elektronen der Reduktionsäquivalente, die die verschiedenen Komponenten der Atmungskette durchfließen. Im letzten Schritt der Atmungskette werden die Elektronen von Komplex IV auf Sauerstoff übertragen, wobei Wasser entsteht. Die ATP-Synthase ist über den insgesamt aufgebauten Protonengradienten indirekt mit der Atmungskette verbunden und braucht die Triebkraft des Gradienten für ihre Funktion. Sie katalysiert die Umsetzung von Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i) zu ATP und sorgt damit für die eigentliche lebenswichtige Energieversorgung der Zelle. Bei der Hydrolyse der energiereichen Thioester-Bindung des Succinyl-CoA zu Succinat im Citratzyklus wird ein Molekül Guanosintriphosphat (GTP) gebildet, das auch weiterführend zur ATP-Synthese genutzt werden kann. Alle aerob arbeitenden Zellen können auf den dargestellten Wegen ATP synthetisieren.

Neben den dargestellten energieliefernden Prozessen gehen noch zahlreiche andere biosynthetische anabole Stoffwechselvorgänge vom Citratzyklus aus. Sein Reaktionsprodukt Citrat wird für die Fettsäurebiosynthese im Zytosol der Zelle aus der Mitochondrien-Matrix exportiert. Succinyl-CoA reagiert mit Glycin zu δ -Aminolävulinsäure, dem Ausgangsstoff der Hämsynthese. Die Umwandlung von Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat stellt einen zentralen Punkt der Gluconeogenese dar. Außerdem startet die Biosynthese der nicht-essentiellen Aminosäuren von den Intermediaten Oxalacetat und α -Ketoglutarat. Die beschriebenen Metabolite gehen

dem Citratzyklus ständig verloren. Um das Funktionieren des Stoffwechselweges aufrecht zu erhalten, müssen sogenannte anaplerotische Reaktionen (anaplero, griech. = auffüllen) den Zyklus wieder mit Intermediaten auffüllen. Die wichtigste anaplerotische Reaktion ist die Carboxylierung von Pyruvat. Pyruvat entsteht im Zytosol bei der Glykolyse und wird in die Mitochondrien-Matrix importiert. Es wird dort von der Pyruvat-Carboxylase zu Oxalacetat umgesetzt und in den Citratzyklus eingeschleust. Der Abbau von Aminosäuren führt zu Pyruvat, Acetyl-CoA oder den Intermediaten α -Ketoglutarat und Oxalacetat, die aus Transaminierungsreaktionen entstehen. Das zytosolische Malat-Enzym, welches Pyruvat unter Verbrauch von NADPH reduktiv zu Malat carboxyliert, wirkt ebenfalls anaplerotisch und führt dem Zyklus Malat zu. Die in Kapitel 1.1 beschriebenen Stoffwechselwege sind schematisch in Abbildung 1-1 dargestellt.^{4, 5}

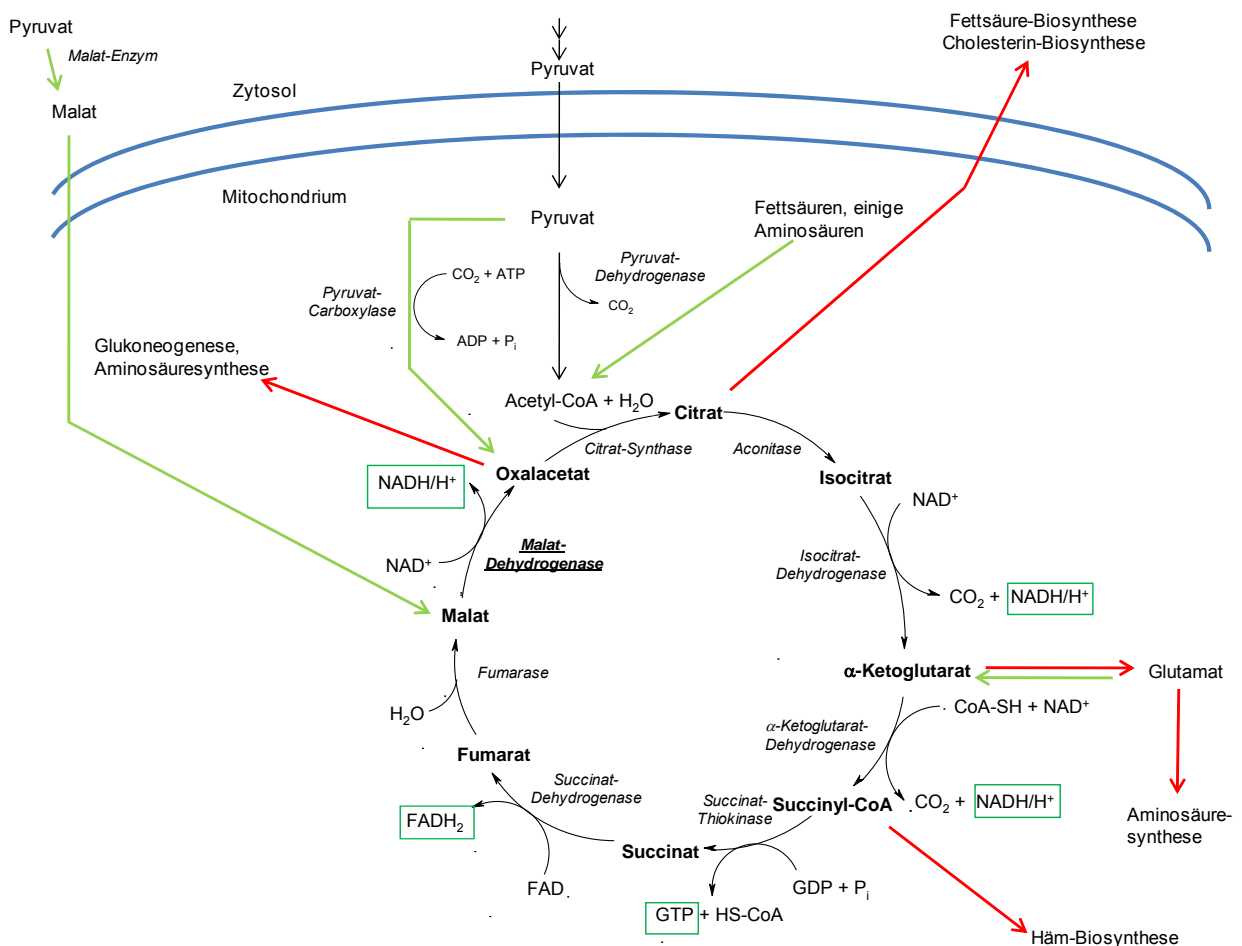
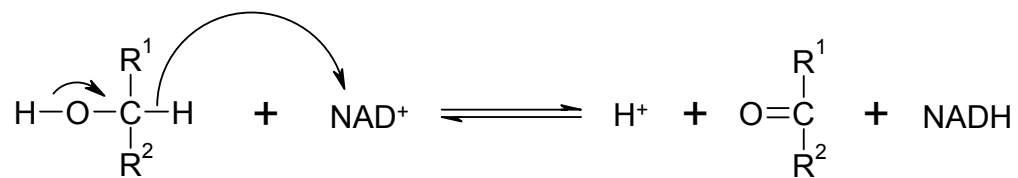


Abbildung 1-1: Der Citratzyklus (modifiziert nach Löffler⁴)

1.2 Die Malatdehydrogenase

Die Malatdehydrogenase (MDH) ist eines der Enzyme des Citratzyklus. Sie katalysiert die Oxidation von Malat zu Oxalacetat unter Gewinnung eines Reduktionsäquivalentes NADH/H^+ und gehört damit zur Enzymklasse der NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen. NAD^+ -abhängige Dehydrogenasen katalysieren die Übertragung eines Hydridions des Substrates auf den Nikotinamidring des NAD^+ . Voraussetzung für diese Übertragung ist das Vorliegen einer HO-C-H -Gruppe im zu oxidierenden Substrat (Schema 1-1).



Schema 1-1: Übertragung des Hydridions eines Substrates auf NAD^+

Im Citratzyklus kommt neben diesen Dehydrogenasen auch eine FAD-abhängige Dehydrogenase, die Succinat-Dehydrogenase, vor, die die Übertragung von zwei Elektronen und zwei Protonen auf FAD katalysiert. FAD-abhängige Dehydrogenasen reagieren bevorzugt mit Substraten, die chemische Gruppen vom Typ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ enthalten.

Das Gleichgewicht der Reaktion von Malat zu Oxalacetat liegt unter Standardbedingungen auf der Seite des Malats. Da Oxalacetat dem Gleichgewicht aber ständig entzogen wird, um einen nächsten Zyklus zu beginnen, läuft die Reaktion trotzdem ab. Die beschriebene Reaktion wird von der mitochondrialen Malatdehydrogenase (mMDH) katalysiert. Die mMDH und ihr Isoenzym, die zytosolische Malatdehydrogenase (cMDH), besitzen außerdem wichtige Funktionen im Malat-Aspartat-Shuttle-System.

1.2.1 Malat-Aspartat-Shuttle

Die Reduktionsäquivalente, die z. B. bei der Glykolyse im Zytosol entstehen, müssen zur Energiegewinnung in die Atmungskette eingebracht werden, deren Enzyme sich an der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran befinden. Die äußere Mitochondrienmembran enthält spezielle Transmembranproteine, Porine, durch die NADH/H^+ problemlos passieren kann. Die innere Mitochondrienmembran darf solche Porine nicht enthalten, da sonst kein Protonengradient für die oxidative Phosphorylierung aufrecht zu erhalten wäre. Für den Transport bestimmter Metaboliten durch die innere Mitochondrienmembran gibt es spezielle Systeme, z. B. das Malat-Aspartat-Shuttle-System (Abbildung 1-2).⁵

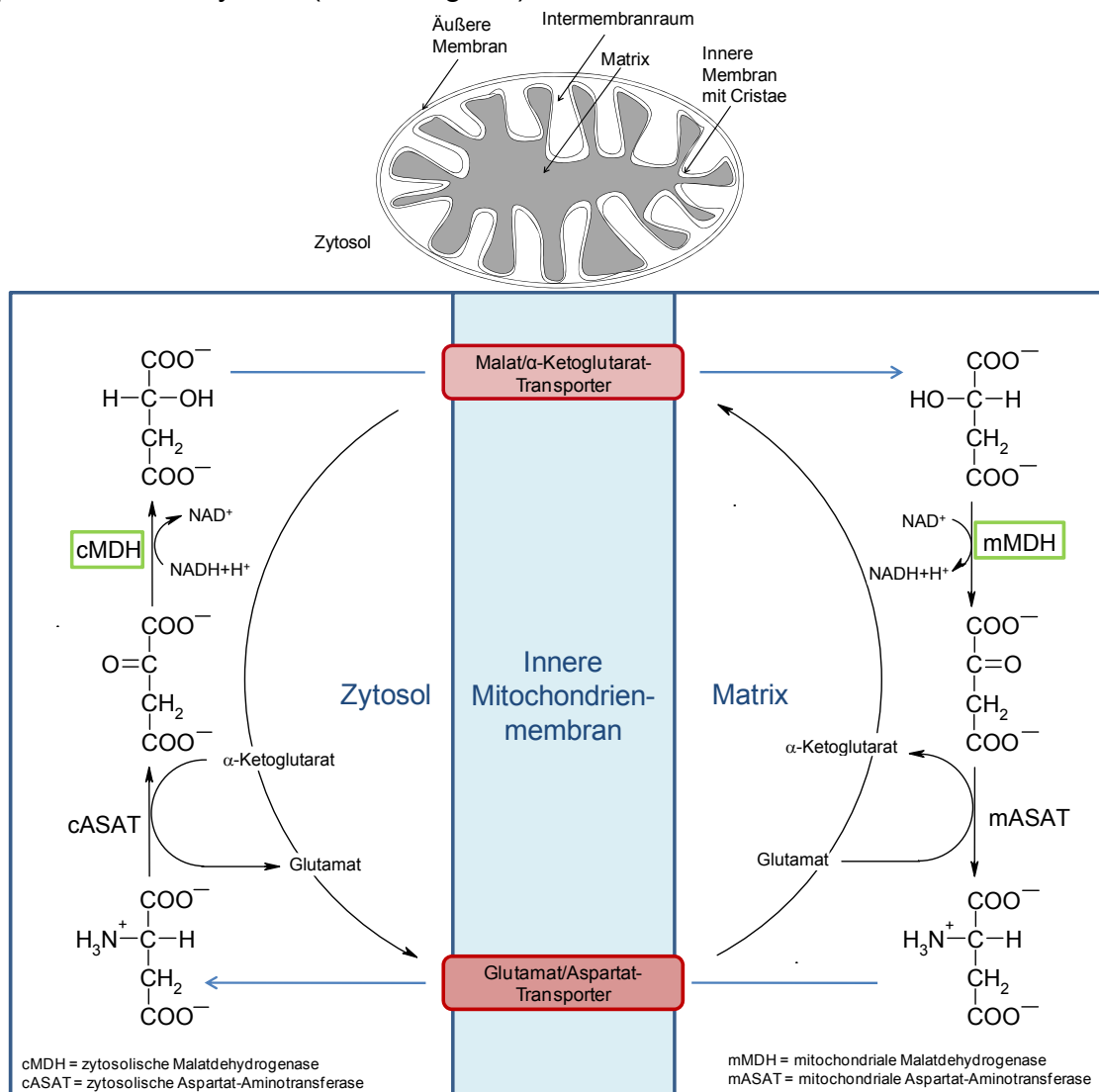


Abbildung 1-2: Aufbau eines Mitochondriums und das Malat-Aspartat-Shuttle-System (modifiziert nach Rassow⁵)

Oxalacetat wird im Zytosol unter Katalyse der zytosolischen Malatdehydrogenase (cMDH) und Verbrauch von NADH/H^+ zu Malat reduziert. Malat kann durch einen Malat/ α -Ketoglutarat Translokator durch die innere Mitochondrienmembran in die Matrix gelangen. In der Matrix wird Malat unter Rückgewinnung der Reduktionsäquivalente NADH/H^+ zu Oxalacetat oxidiert. Diese Reaktion wird wiederum von der mitochondrialen Malatdehydrogenase (mMDH) katalysiert. NADH/H^+ steht nun in der mitochondrialen Matrix zur Verfügung und kann für die ATP-Gewinnung genutzt werden. Oxalacetat wird durch die mitochondriale Aspartat-Aminotransferase (mASAT) zu Aspartat, welches die Mitochondrienmatrix durch den Glutamat/Aspartat-Transporter verlässt und im Zytosol wieder Oxalacetat generiert.

1.2.2 Struktur der Malatdehydrogenase

Malatdehydrogenasen sind multimere Enzyme, die aus identischen Untereinheiten mit Molekulargewichten von 30-35 kDa bestehen. Die mMDH ist aus 314 Aminosäuren aufgebaut und liegt in wässriger Lösung als Dimer, in kristalliner Form als Tetramer vor. Jede Untereinheit besitzt eine Nukleotid-bindende Domäne, die in ihrer Sequenz und Struktur den Cofaktor-bindenden Domänen anderer NAD^+ -abhängiger Enzyme, wie z. B. der Lactatdehydrogenase, ähnelt. Obwohl die Primärsequenzen der cMDH und der mMDH nur ca. 20 % Übereinstimmung besitzen, weisen die dreidimensionalen Strukturen der beiden Isoenzyme eine große Ähnlichkeit auf.⁶ Die Lokalisation der Coenzym-Bindestelle, die Position katalytisch bedeutender Aminosäuren und wichtige Elemente der Sekundärstruktur sind identisch bei allen MDHs. Den aktiven Bereich der MDH, der Bindestellen für das Substrat und den Nikotinamidring des Cosubstrates enthält, bildet eine hydrophobe Tasche. Die MDH, ihr Substrat Malat und der Cofaktor NAD^+ bilden einen ternären Komplex in diesem hydrophoben Bereich (Abbildung 1-3). Verschiedene konservierte Aminosäuren sind an der Stabilisierung des Komplexes beteiligt.^{7, 8} Die Seitenkette einer Asparaginsäure der MDH ist wichtig für die Wasserstoffbrückenbindung zur Riboseeinheit des NAD^+ . Bei der in Abbildung 1-3 dargestellten humanen mMDH stabilisieren die Guanidinreste der Seitenketten von Arginin 86, 92 und 158 die beiden Carboxylgruppen des Malats. Der Imidazolring des Histidins in Position 182 bildet mit der

Asparaginsäure in Position 155 das sogenannte Histidin-Aspartat-Paar, welches ein Protonenübertragungssystem bildet und dafür sorgt, dass der Imidazolring des Histidins als Säure und als Base, also als Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor, fungieren kann. Diese Funktion ist entscheidend für den Wasserstofftransfer zwischen Cosubstrat und Substrat.

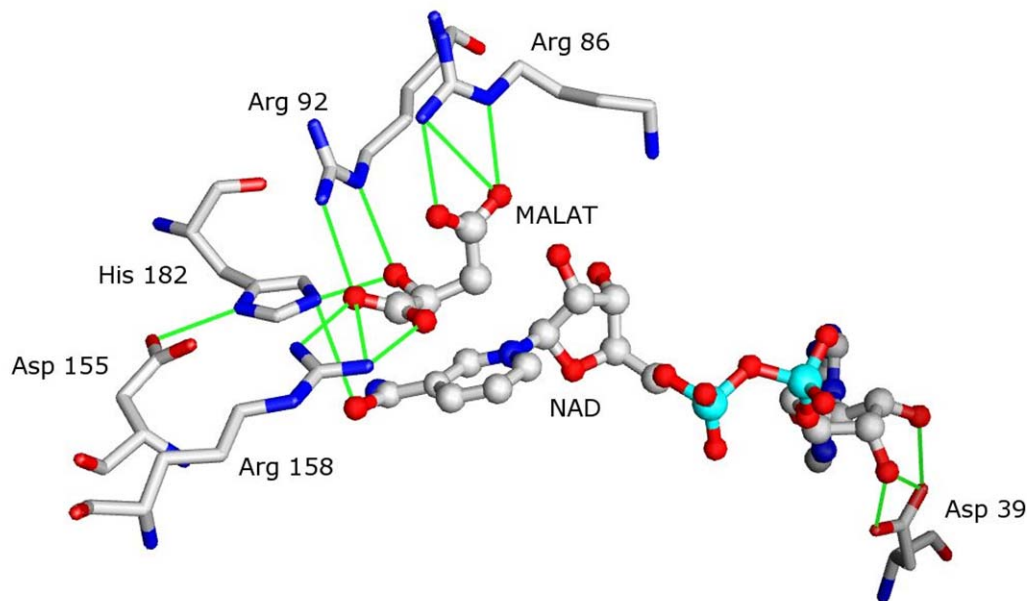


Abbildung 1-3: Ternärer Komplex aus mMDH, Malat und NAD⁺

Die dieser Abbildung zugrundeliegende Röntgenkristallstruktur der humanen mitochondrialen Malatdehydrogenase wurde unter dem Identifikationscode 2dfd der Proteindatenbank (PDB) entnommen. Der ternäre Komplex des Enzyms mit seinem Substrat Malat und dem Cosubstrat NAD⁺ wurde von Dr. L. Preu (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig) mit dem Programm Chimera visualisiert.⁹ Die grünen Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar.

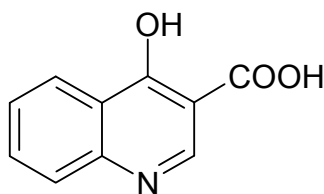
NAD⁺-kompetitive Inhibitoren der MDH können NAD⁺ aus diesem ternären Komplex reversibel verdrängen und auf diese Weise die Aktivität des Enzyms senken.

1.2.3 Die Malatdehydrogenase als Target und ihre Inhibitoren

Die meisten antitumoraktiven Substanzen, die derzeit auf dem Markt verfügbar sind, greifen in Vorgänge des Zellzyklus ein.¹⁰ Alle diese Wirkstoffe zielen auf sich schnell teilende Zellen und entfalten ihre Wirkung entweder über Eingriffe in die Mitose der Zelle oder über Veränderungen an der DNA. In die M-Phase des Zellzyklus (Mitose-Phase) greifen z. B. die Vinca-Alkaloide und Taxane ein, die mit verschiedenen Stufen der Spindelapparatentwicklung interagieren. Alkylierende Wirkstoffe, Topoisomerase-Hemmstoffe und interkalierende Substanzen beeinflussen die DNA-Synthese der Zelle. Antimetabolite werden statt der eigentlichen Substrate in die DNA eingebaut und blockieren so deren Funktion. Während der G₀-Phase, der sogenannten Ruhephase der Zellen, können diese Wirkstoffe keine Wirkung entfalten. Viele solide Tumore haben eine geringere Zellteilungsrate, so dass sie sich häufig in der G₀-Phase befinden.¹¹ Während dieser Ruhephase sind die Zellen trotzdem auf eine kontinuierliche Energiezufuhr, wahrscheinlich in Form von Glucose, angewiesen. Auf dieser Tatsache basierend veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Baker und Bramhill den Eingriff in den Glucose-Metabolismus als potentiell neues Therapiekonzept für solide Tumore. Werden Enzyme des Energiestoffwechsels, wie z. B. die MDH, gehemmt, wird die Tumorzelle, die einen besonders hohen Energiebedarf hat, nicht mehr ausreichend versorgt und stirbt idealerweise ab. Einige Krebszellen weisen abnormale Konzentrationen an Lactatdehydrogenase (LDH), MDH und anderen Enzymen des Energiestoffwechsels auf.¹²⁻¹⁴ In Brustkrebs-Tumoren bei Ratten konnten experimentell erhöhte Glykolyseraten und damit verbundene erhöhte Aktivitäten verschiedener Enzyme des aeroben und anaeroben Glucoseabbaus festgestellt werden.¹⁵ In Lymphknotentumoren von Hunden war die MDH-Aktivität gegenüber der in gesunden Lymphozyten gemessenen Aktivität deutlich erhöht. Gleichzeitig wurden erniedrigte Lactatdehydrogenasespiegel gemessen. Der MDH/LDH-Quotient ist ein guter Indikator für den Glucoseverbrauch in tierischen Zellen.¹⁶ Die verschiedenen Veröffentlichungen berichten alle über veränderte Enzymkonzentrationen in malignen Geweben. Durch gezielte Inhibition einzelner Enzyme könnte man Einfluss auf den Energiehaushalt der entarteten Zellen nehmen. Im Folgenden werden literaturbekannte Hemmstoffe der Malatdehydrogenase vorgestellt. Die Synthese neuer Inhibitoren dieses Enzyms ist ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

Chinolincarbonsäuren

Baker und Bramhill berichten in einer Reihe von Veröffentlichungen^{11, 17-20} über die inhibitorische Wirkung von Chinolincarbonsäuren **1** gegenüber vier verschiedenen Dehydrogenasen des Energiestoffwechsels. Sie untersuchten die Glutamatdehydrogenase, die den Glucose-Stoffwechsel mit dem Aminosäure-Stoffwechsel verbindet und drei weitere Dehydrogenasen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Lactatdehydrogenase und Malatdehydrogenase), die direkt mit dem Glucose-Stoffwechsel zusammenhängen. Im Folgenden werden die Wirkungen der von Baker und Bramhill dargestellten Verbindungen auf die MDH, die am empfindlichsten auf die Verbindungen reagierte, näher erläutert. Die Leitstruktur, die 4-Hydroxychinolin-3-carbonsäure (**1a**) (Abbildung 1-4), zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 500 µM eine sehr schwache Hemmung der MDH.



1a

Abbildung 1-4: 4-Hydroxychinolin-3-carbonsäure (**1a**)

Ihr Strukturisomer, welches die Carboxylfunktion an Position 2 des Chinolinringes trägt, ist mit einem IC₅₀-Wert von 280 µM etwas aktiver. Die Einführung von lipophilen Substituenten in den aromatischen Chinolinring führt zu einer deutlichen Wirkungssteigerung gegenüber der Muttersubstanz **1a**. So zeigt z. B. das 6,8-dichlorsubstituierte Derivat **1b** einen IC₅₀-Wert von 63 µM an der MDH. In weiteren Optimierungsschritten wurden größere Substituenten in die Positionen 5 und 6 des Chinolinringes eingebracht, um durch die Erhöhung von hydrophoben Wechselwirkungen des Inhibitors mit der MDH eine höhere Bindungsaffinität zu erreichen. Das an Position 6 phenylpropoxysubstituierte Derivat **1c** hat einen IC₅₀-Wert von 2.7 µM und zeigt damit eine erheblich gesteigerte Inhibition gegenüber der MDH. 8-Chlor-5-[2-(2,6-dichlorphenyl)ethyl]-4-hydroxychinolin-3-carbonsäure (**1d**) ist mit

einem IC_{50} -Wert von $0.1 \mu M$ der aktivste MDH-Inhibitor, der von der Arbeitsgruppe dargestellt werden konnte (Abbildung 1-5).

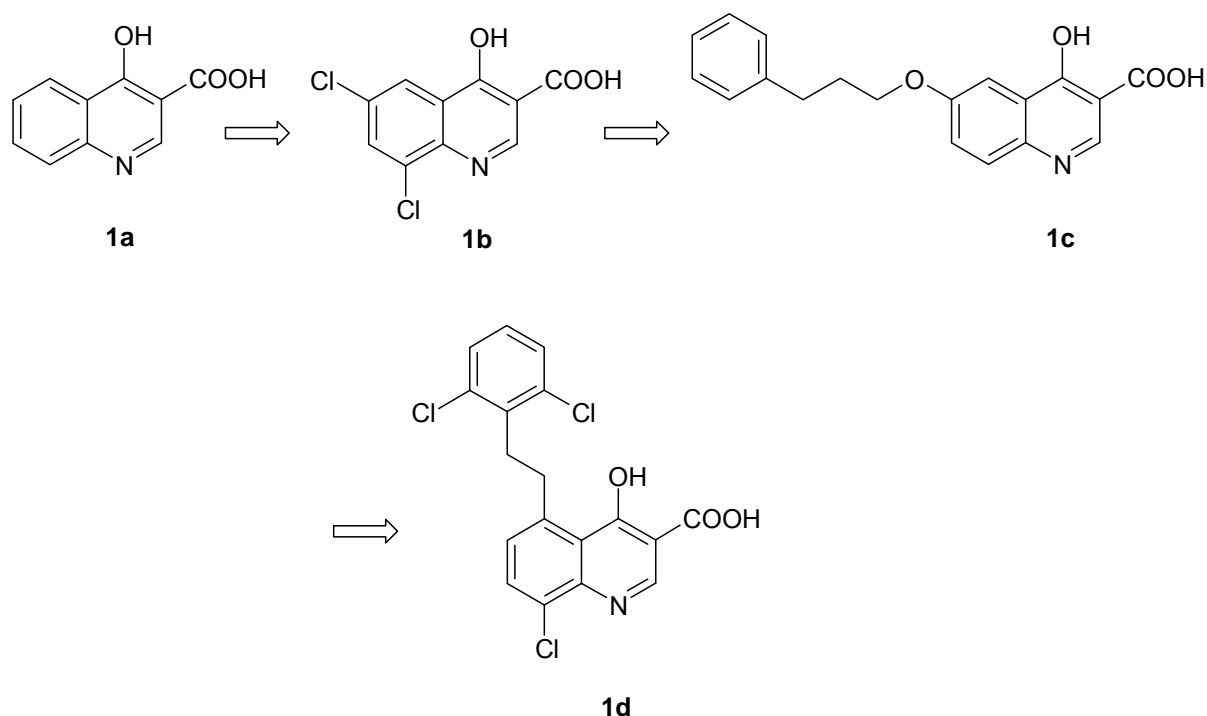


Abbildung 1-5: Optimierung der Chinolin-3-carbonsäuren **1** nach Baker und Bramhill

Die Arbeitsgruppe um Shah und Coats^{12, 21, 22} beschäftigte sich mit der Untersuchung der Wirkung von 4-Hydroxychinolin-3-carbonsäurederivaten **1** auf die Zellatmung von Ehrlich-Aszites-Zellen. Die Zellatmung stellt den gesamten Komplex der sauerstoff-verbrauchenden energieliefernden Prozesse dar. Die Arbeitsgruppe untersuchte neben der Wirkung der Substanzen auf dieses Zellmodell die Wirkung auf die mitochondriale Malatdehydrogenase als potentiell intrazelluläres Targetenzym und versuchte eine Korrelation zwischen beiden Effekten herzustellen. Die mMDH wurde als intrazelluläres Targetenzym ausgewählt, da dieses Enzym sich, wie schon in den Studien von Baker und Bramhill berichtet, als besonders empfindlich gegenüber der beschriebenen Verbindungsklasse **1** zeigte. Die Messergebnisse zeigen, dass **1** Inhibitoren der Zellatmung von Ehrlich-Aszites-Zellen sind. Die Verbindungen **1** sind also in der Lage, Zellmembranen zu permeieren und den Sauerstoffverbrauch der Zellen zu senken. Dieser Sauerstoffverbrauch wurde in dem verwendeten Zellsystem

mit einer O₂-Elektrode potentiometrisch bestimmt. Ein direkter quantitativer Zusammenhang zwischen der Hemmung der Zellatmung von Ehrlich-Aszites-Zellen und der Inhibition der intrazellulären mMDH konnte mit der verwendeten Korrelationsanalyse nicht gezeigt werden, obwohl generell die Inhibition beider Testsysteme mit steigender Lipophilie der Substanzen zunahm. Vermutlich spielen noch andere Prozesse bei der Hemmung der Zellatmung eine Rolle.

Indisulam

Indisulam (E7070) (**2**) ist ein Chlorindolsulfonamid mit antiproliferativer Aktivität gegenüber einer Vielzahl von humanen Krebszelllinien. Es arretiert dosis- und zeitabhängig den Zellzyklus in der G1-Phase und bewirkt eine Hochregulation von p53 und p21 mit anschließender Apoptose.^{23, 24} Indisulam (**2**) reguliert sowohl Gene herunter, die kritische Rollen im Zellzyklus spielen, als auch Gene, die für den Energiestoffwechsel und für zelluläre Redoxvorgänge wichtig sind. Versuche, die entscheidende zelluläre Zielstruktur von Indisulam (**2**) zu finden, waren bisher noch nicht erfolgreich. Oda und Mitarbeiter konnten die zytosolische Malatdehydrogenase (cMDH) als spezifisch bindendes Protein mit Hilfe von Affinitätsmatrizen und quantitativer Proteomanalyse identifizieren. Inwieweit die Inhibition dieser Dehydrogenase des Energiestoffwechsels Auswirkungen auf den beschriebenen antiproliferativen Effekt von Indisulam (**2**) hat, ist bis jetzt noch nicht geklärt. Proteine, die zellzyklusregulierende Funktionen haben, konnten mit den Affinitätsuntersuchungen nicht gefunden werden. Allgemein konnte allerdings oft gezeigt werden, dass Energie- und Redoxzustände in Zellen eng mit dem Zellzyklus verbunden sind.²⁵ Der Wirkstoff befindet sich derzeit in klinischen Studien der Phase II, in denen er z. B. zur *second-line* Therapie bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungentumoren eingesetzt wird.^{26, 27}

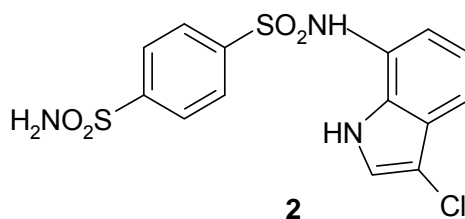


Abbildung 1-6: Struktur des Sulfonamidderivates Indisulam (**2**)

Nukleotide

Harris und Mitarbeiter²⁸ untersuchten die Inhibition der mMDH durch die Nukleotide cAMP, AMP, ADP und ATP. Die experimentellen kinetischen Untersuchungen zeigten, dass alle Nukleotide die mMDH kompetitiv inhibieren, wobei sich cAMP als die aktivste Verbindung herausstellte. Mit Hilfe von molekularem Docking untersuchte die Arbeitsgruppe verschiedene Konformationen und Orientierungen des Coenzym NAD⁺ und der Inhibitoren in der Coenzym-bindenden Seite der mMDH. Sie konnte energieminierte Konformationen der Inhibitoren finden, die in einer ähnlichen Orientierung wie der Adeninring des NAD⁺ in der mMDH lagen. Diese computergestützten Ergebnisse bekräftigen die Annahme der kompetitiven Enzym-inhibition.

Paullone

Paullone (7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one, **3**) zeigen inhibitorische Aktivität gegenüber Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) und antiproliferative Aktivität gegenüber humanen Krebszelllinien.²⁹ Kenpaullon (9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on, **3a**) ist ein sehr potenter, selektiver Inhibitor von CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und CDK5/p25 mit IC₅₀-Werten kleiner als 1 µM. Kenpaullon (**3a**) wurde zur Leitstruktur für die Synthese einer großen Substanzbibliothek unterschiedlich substituierter Paullone. Alle Verbindungen wurden auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität und ihre *in vitro* Antitumoraktivität überprüft. Eine starke antiproliferative Aktivität korreliert dabei nicht immer mit einer hohen CDK-inhibitorischen Potenz, so dass andere Effekte oder Mechanismen eine Rolle spielen müssen.³⁰ Bei affinitätschromatographischen Untersuchungen mit zwei immobilisierten Kenpaullon-Derivaten konnten als weitere Targets der Paullone die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3 α und GSK-3 β) und die mitochondriale Malatdehydrogenase (mMDH) identifiziert werden. Auch die mMDH des Protozoen *Leishmania mexicana* wurde als Paullon-bindendes Protein identifiziert.³¹ Paullone **3** bewirken eine Wachstumshemmung bei diesen Parasiten. Inwieweit die Inhibition der parasitären mMDH an dieser Wachstumshemmung beteiligt ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden.³² Paullone inhibieren die mMDH mit IC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich und in geringerem Ausmaß auch die

cMDH. Knockaert konnte durch enzymkinetische Untersuchungen zeigen, dass Paullone und NAD^+ vermutlich um dieselbe Bindestelle an der mMDH konkurrieren und dass ein kompetitiver Hemmmechanismus vorliegen muss. Kohfeld untersuchte in ihrer Arbeit eine Paullonbibliothek auf mMDH-inhibitorische Eigenschaften. Für Kenpaullon (**3a**) wurden IC_{50} -Werte um $15\ \mu\text{M}$ ermittelt. Hervorzuhebende stark inhibitorisch aktive Paullone sind nach den Ergebnissen von Kohfeld die 9-Carbonsäureester **4** und die am Lactam-Stickstoff benzylsubstituierte Struktur **5a** (Abbildung 1-7). Für **4** konnte eine positive Korrelation zwischen steigender Lipophilie (cLogP-Wert) und der mMDH-Hemmung (pIC_{50} -Wert) gezeigt werden. So sind der 9-Carbonsäurehexylester **4a** und der 9-Carbonsäureoctylester **4b** mit IC_{50} -Werten von 4.3 und $2.7\ \mu\text{M}$ die aktivsten Vertreter dieser Verbindungsklasse. Bei Anwesenheit von $10\ \mu\text{M}$ der Verbindung **5a** zeigte die mMDH eine Restaktivität von 8.6% .³³ Ein IC_{50} -Wert für **5a** wurde erst im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt.

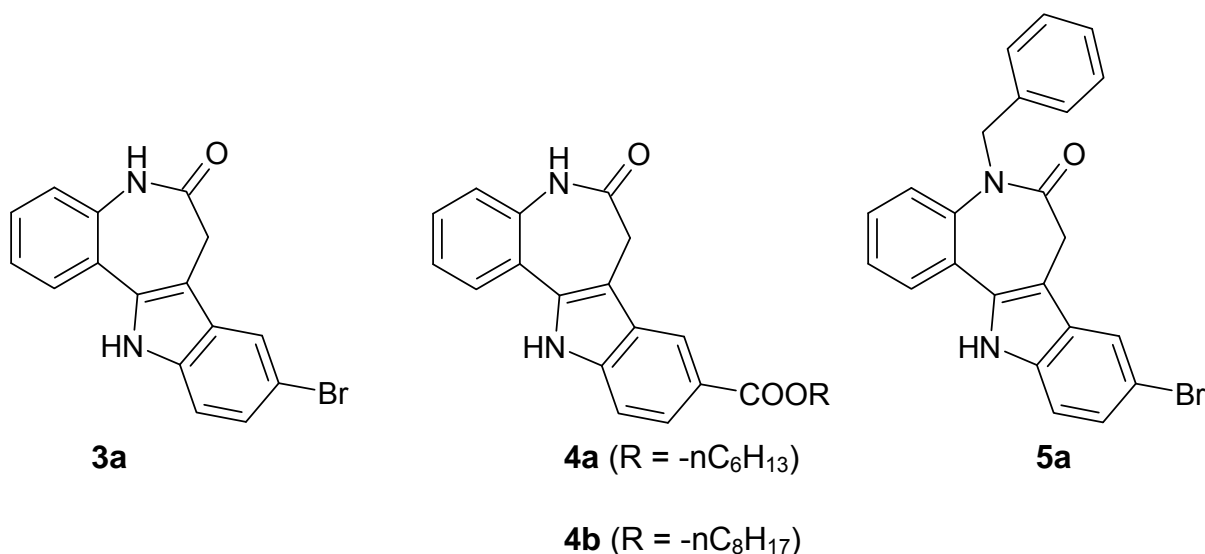
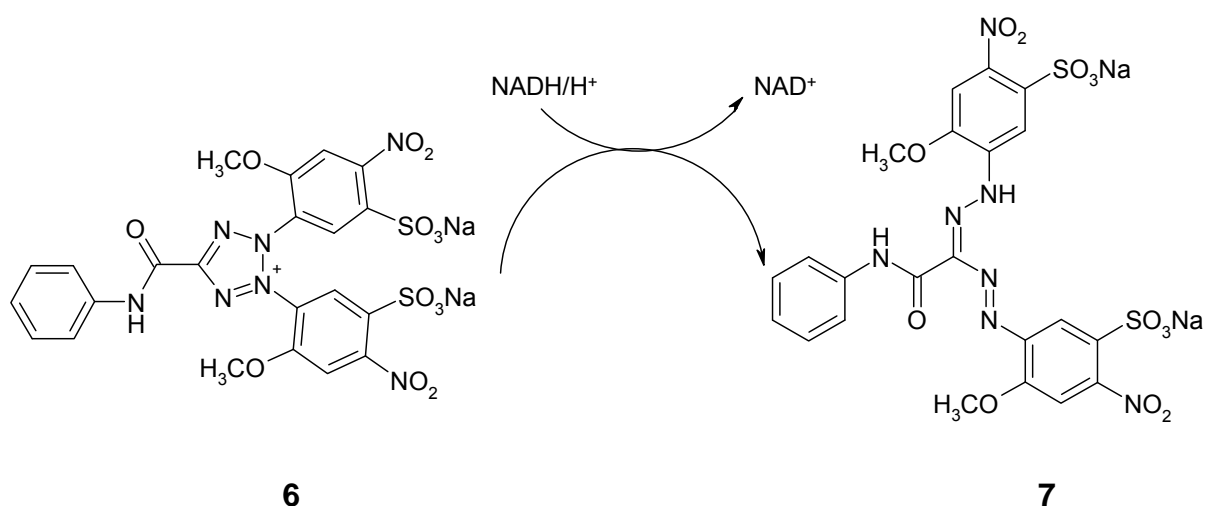


Abbildung 1-7: Strukturen mMDH-inhibitorischer Paullone

1.2.4 Testsysteme für potentielle MDH-Inhibitoren

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben stellen MDH-Hemmstoffe eine interessante potentielle Wirkstoffklasse dar. Für die Identifizierung von Inhibitoren der Malatdehydrogenase stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Bei konventionellen Methoden wird das bei der Oxidation von Malat zu Oxalacetat entstehende NADH/H⁺ spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen festgelegten Zeitraum verfolgt. Ein solches Verfahren wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet und wird in Kapitel 4.1.1 näher erläutert. Da diese Methode nur einen relativ geringen Probendurchsatz ermöglicht und so sehr zeitintensiv ist, beschäftigen sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Übertragung des MDH-Testsystems auf *high-throughput screening* (HTS, bedeutet: Hochdurchsatz-Testung).^{34, 35} Die Entstehung von NADH/H⁺ kann an die Bildung eines Formazans aus einem Tetrazoliumsalz gekoppelt werden. NADH/H⁺ reduziert das Tetrazoliumsalz zu einem gefärbten Formazan, das photometrisch bestimmt wird, und wird dabei selbst wieder zu NAD⁺ oxidiert (Schema 1-2). Die Inkubation des Reaktionsansatzes kann direkt auf den Mikrotiterplatten (z. B. Platten mit 96 Vertiefungen) erfolgen, die dann in einem Plattenreader vermessen werden.



Schema 1-2: Reduktion des Tetrazoliumsalzes **6** zu dem gefärbten Formazan **7** gekoppelt an die Oxidation von NADH/H⁺³⁵

Mit Hilfe des dargestellten Verfahrens können MDH-Hemmstoffe sehr schnell und einfach identifiziert werden. Große Substanzbibliotheken von chemischen Strukturen können auf ihr Potential, dieses NAD^+ -abhängige Enzym zu inhibieren, untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um M. Jung (Universität Freiburg) beschäftigt sich intensiv mit der Synthese und Testung von Verbindungen, die humane Sirtuine inhibieren sollen. Diese Enzyme, Histondesacetylasen der Klasse III, sind in ihrem Katalysenmechanismus auch von NAD^+ abhängig. Die Arbeitsgruppe untersucht mit dem beschriebenen MDH-Testsystem die Selektivität ihrer Sirtuininhibitoren gegenüber der Malatdehydrogenase.

In diesem Zusammenhang wurden umgekehrt aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Inhibitoren der mitochondrialen Malatdehydrogenase vom Arbeitskreis Jung auf ihre Wirkung an humanen Sirtuinen getestet. Zum Verständnis der zugrundeliegenden biologischen Funktionen der Histondesacetylasen der verschiedenen Klassen werden diese in den nächsten Kapiteln näher erläutert.

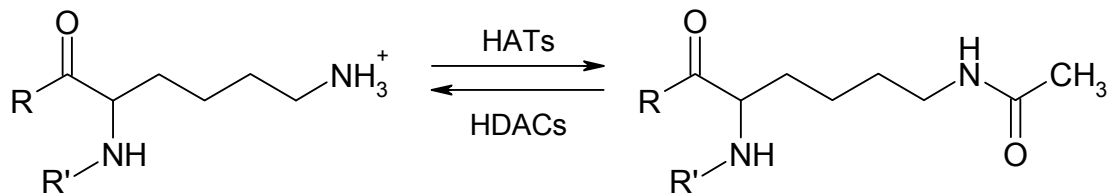
1.3 Histondesacetylasen

Das eukaryontische Genom ist in Form des Chromatins kompakt im Zellkern verpackt. Die grundlegende Einheit dieses Chromatins besteht aus den sogenannten Nukleosomen, die auch core-Partikel genannt werden. Nukleosomen sind aus der DNA und basischen Proteinen, den Histonen, aufgebaut. 145-147 Basenpaare der negativ geladenen DNA sind um einen Komplex aus acht Histonen (je zweimal H2A, H2B, H3 und H4) herumgewickelt, so dass die DNA kompakt verdrillt vorliegt.³⁶ Die Abfolge von vielen Nukleosom-Einheiten bildet dann das Chromatin, das in seiner Struktur oft mit einer Perlenkette verglichen wird. Die endgültige Strukturaufklärung des Chromatins gelang 1997 mittels Röntgenkristallographie.³⁷

Die *N*-Termini der Histone bestehen aus hoch konservierten Ketten, die an der Oberfläche des Nukleosoms präsentiert werden und reich an Lysinresten sind. Diese Lysinreste bieten Angriffspunkte für zahlreiche posttranslationale Proteinmodifikationen, wie z. B. Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung, Ribosylierung oder Acetylierung.³⁸ Alle diese Modifikationen am Chromatin bewirken Veränderungen in der Genexpression.³⁹ Bestimmte Genabschnitte in einem Organismus werden sehr häufig, andere dagegen selten transkribiert. Es ist möglich,

durch der Transkription vorgelagerte epigenetische Mechanismen den Phänotyp einer Zelle zu modifizieren, ohne ihren Genotyp zu beeinflussen. Der sogenannte „Histon-Code“ ist ein Beispiel für einen solchen Mechanismus. Die verschiedenen kombinierten Histonmodifikationen bewirken *downstream* die Transkription von bestimmten Genabschnitten.

Im Folgenden wird die für diese Arbeit relevante Enzymklasse der Histon-desacetylasen näher erläutert. Die Übertragung einer Acetylgruppe auf einen Lysinrest wird durch Histonacetyltransferasen (HATs) katalysiert und bewirkt eine Ladungsabschwächung der unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Aminofunktion des Lysins. Diese Ladungsabschwächung hat zur Folge, dass die Anziehungskraft zwischen dem Phosphatanteil der DNA und dem Histon geschwächt wird und Transkriptionsfaktoren leichter an die DNA gelangen, um die Transkription einleiten zu können. Die den HATs entgegengesetzt wirkenden Histondesacetylasen (HDACs) desacetylieren die Lysinreste wieder, und ein stärkerer Verdrillungsgrad tritt ein. Durch das Zusammenwirken der HATs und der HDACs tritt also ein spezifischer Acetylierungsgrad an den Histonen ein (Schema 1-3).³⁸⁻⁴⁰



Schema 1-3: Einstellung eines spezifischen Acetylierungsgrades (modifiziert nach Schäfer³⁹)

Die 18 bekannten humanen Histondesacetylasen werden nach der Struktur ihrer untergeordneten Domänen in vier Klassen eingeteilt (Kapitel 1.3.1 und 1.3.2).

1.3.1 Histondesacetylasen der Klassen I, II und IV und deren Inhibitoren

Klasse I (HDAC 1-3 und 8), Klasse II (HDAC 4-7, 9 und 10) und Klasse IV (HDAC11) Histondesacetylasen sind Zn^{2+} -abhängige Amidohydrolasen und werden auch als „klassische HDACs“ bezeichnet.⁴¹ Ihr Katalysemechanismus ähnelt dem anderer Metallo- oder Serin-Proteasen: Das Zn^{2+} -Ion koordiniert an das Carbonyl-Sauerstoffatom der Acetylfunktion und erhöht dadurch die Elektrophilie am Carbonyl-Kohlenstoffatom, welches daraufhin leichter nukleophil von einem Wassermolekül angegriffen werden kann. Die Amidbindung wird hydrolysiert.⁴²

Die Suche nach potenten Inhibitoren der HDACs führte zu einer neuen Klasse von innovativen Antitumorwirkstoffen.⁴³ Ein bestimmter Acetylierungsgrad eines Histons kann entweder zu einer gesteigerten Genexpression oder zum Stilllegen einiger Genabschnitte führen. Inhibitoren der HDACs bewirken eine Hyperacetylierung von Chromatin und damit in den meisten Fällen eine Aktivierung bestimmter Gene, die vielfältige biologische Effekte, wie z. B. Induktion von Differenzierung, Apoptose, Inhibition von Angiogenese und Wachstumsstopp, zur Folge haben. Diese Effekte konnten in verschiedensten Zellkulturmodellen und in krebserkrankten Versuchstieren demonstriert werden.⁴⁴ Gene, die von HDAC-Inhibitoren hochreguliert werden, sind z. B. die der Tumorsuppressoren p21 und p16, Gelsolin und Caspasen. p21 und p16 sind Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen und ihre Aktivierung führt zu einem Zellzyklusarrest.⁴⁵ Die Gene für VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und verschiedene Cyclinproteine werden von den Inhibitoren herunterreguliert. Außerdem konnten Veränderungen im Acetylierungsgrad spezifischer Lysinreste mit der Pathogenese verschiedener Krebsarten assoziiert werden, so dass die Korrektur dieser Veränderungen in die Tumorentwicklung eingreifen könnte.

Das fungistatische Antibiotikum Trichostatin A (**8**) wurde als potenter Inhibitor der HDAC-Klassen I und II identifiziert.⁴⁶ Diverse strukturelle Modifikationen von **8** führten zu einer Reihe von potenten Hemmstoffen dieser Enzymklassen. Die Inhibitoren weisen Strukturelemente auf, die eine optimale Bindung in die Bindetasche der Enzyme ermöglichen. Sie tragen eine endständige Hydroxamsäuregruppe, die das Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum bindet, eine Linker-Domäne, die die röhrenförmige Bindetasche auskleidet, und eine hydrophobe Oberfläche, die mit anderen Resten der Bindetasche interagiert.⁴⁷ Vorinostat (**9**) (Suberoylanilid-

hydroxamsäure, SAHA) ist der erste Histondesacetylaseinhibitor, der im Oktober 2006 von der FDA in Amerika als Drittlinientherapie zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen wurde und von der Firma Merck unter dem Handelsnamen Zolinza® auf den Markt gebracht wurde.⁴⁸ Der Antrag auf Marktzulassung in Europa ist bei der EMEA Anfang des Jahres 2008 eingereicht worden. Da Vorinostat ein breites Antitumorwirkspektrum aufweist, laufen klinische Studien zur Anwendung der Substanz bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC), multiplem Myelom und myelodysplastischem Syndrom.⁴⁹

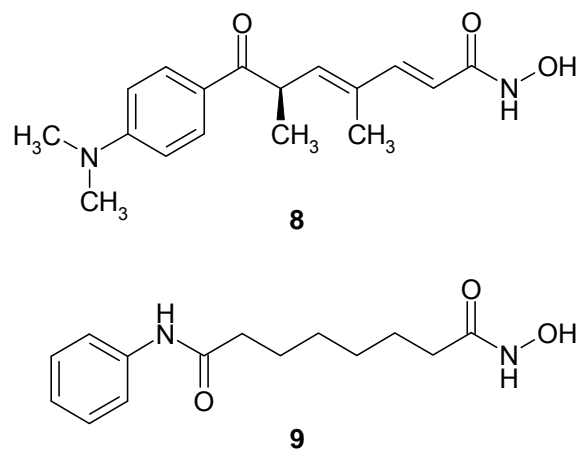
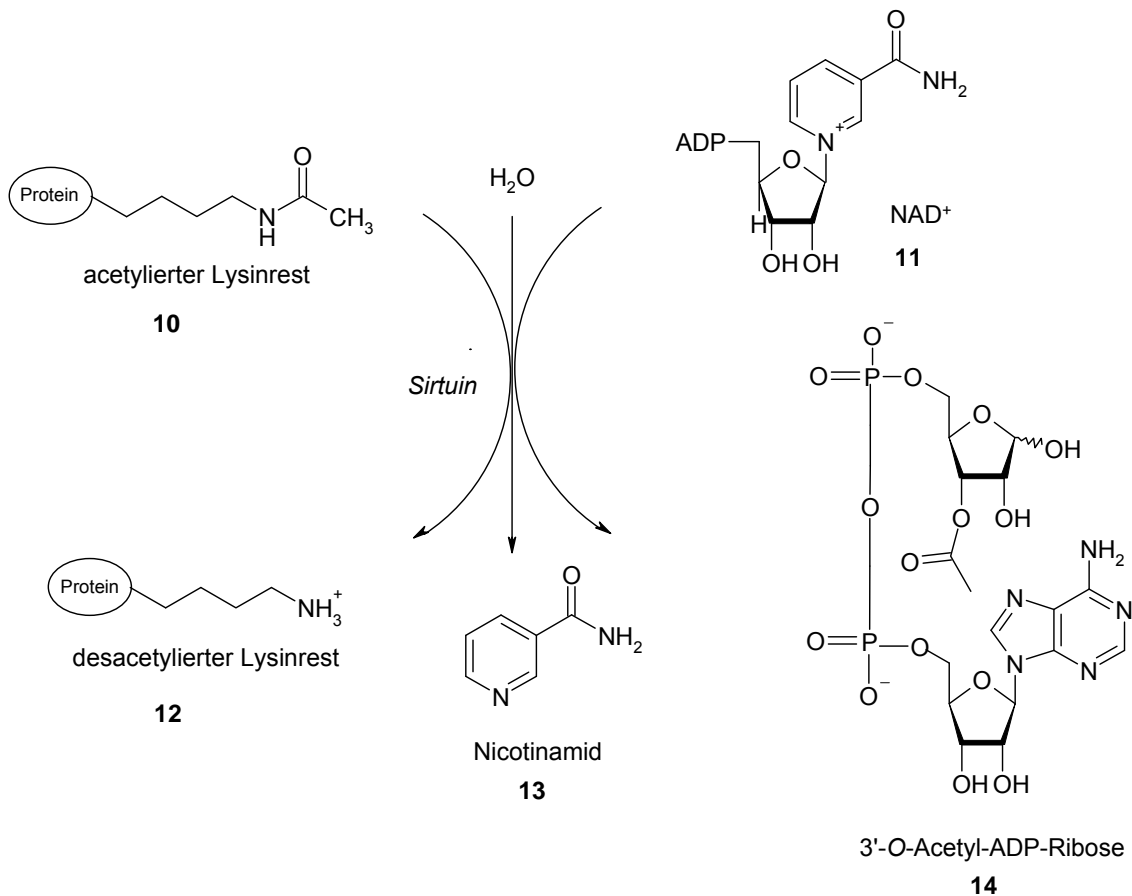


Abbildung 1-8: Strukturen der HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (**8**) und Vorinostat (**9**)

1.3.2 Sirtuine

Sirtuine sind Histondesacetylases der Klasse III und unterscheiden sich in ihrem Katalysemechanismus grundlegend von den in Kapitel 1.3.1 dargestellten Enzymen. NAD^+ (**11**) fungiert bei den Sirtuinen nicht als Hydridion-, sondern nach Hydrolyse der Nicotinamid-Funktion als Acetylakzeptor. Das acetylierte Lysin **10** wird des-acetyliert, und der Acetylrest wird auf den 2'- oder 3'-Rest der Ribose des NAD^+ übertragen. Es entstehen eine Mischung aus 2'- und 3'-O-Acetyl-ADP-Ribose **14**, Nicotinamid (**13**) und die freie Lysingruppe der Seitenkette des jeweiligen Substrats **12** (Schema 1-4). Da Sirtuine nicht nur Histone sondern auch andere Proteine wie z. B. das Tumorsuppressorprotein p53 und α -Tubulin desacetylieren, ist es korrekter, von Sirtuinen als Proteindesacetylases zu sprechen. Die Homologie aller sieben Mitglieder der Enzymfamilie mit Sir2 („*silent information regulator 2*“), das erstmals in

der Bäckerhefe *S. cerevisiae* entdeckt und charakterisiert worden ist, führte zum Namen Sirtuine.



Schema 1-4: Reaktionsschema der Sirtuine modifiziert nach Sauve⁵⁰

Viele Substrate der Sirtuine (SIRT1-7) sind inzwischen identifiziert worden. Man kann die Substrate zusammenfassend nach deren biologischen Funktionen in drei große Untergruppen einteilen: Substrate, die an der Transkription, der Apoptose und an metabolischen Prozessen beteiligt sind. So zählen neben den Histonen H1, H3 und H4 z. B. p53, p73, FOXOs und NF- κ B zu den Substraten von SIRT1. Die Desacetylierung von p53 führt zu dessen Inaktivierung und Abbau. Es kommt zu einer Apoptosehemmung, zu einem Verlust von DNA-Reparaturmechanismen und zu einer veränderten Zellzykluskontrolle. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist in 50% aller menschlichen Tumore mutiert, sein Funktionsverlust spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Krebs. SIRT2 kommt hauptsächlich im Zytoplasma der Zelle vor und desacetyliert das zytoplasmatische Protein α -Tubulin an Lysin-40 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Desacetylierung des α -Tubulins steuert die Entstehung der

Mikrotubuli aus der Polymerisation von Heterodimeren aus α -Tubulin und β -Tubulin. Mikrotubuli haben wichtige Funktionen bei der Aufrechterhaltung der äußeren Form der Zelle, bei Transportvorgängen und bei der Zellteilung.⁵¹ Die Desacetylierung des Histons H4, ebenfalls ein Substrat von SIRT2, führt zur Heterochromatinbildung. Der Zusammenhang zwischen den dargestellten Effekten der SIRT2-vermittelten Desacetylierungen und einer Kontrolle des Zellzyklus ist zu vermuten, konnte experimentell allerdings noch nicht nachgewiesen werden.^{35, 42} FOXO-Proteine (*Forkhead box type O*) sind wichtige Transkriptionsfaktoren, die zum Teil auch von SIRT1 und 2 reguliert werden. FOXOs sind beteiligt an DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Reaktion auf oxidativen Stress, Apoptose und Metabolismus.⁵²

1.3.3 Inhibitoren der Sirtuine

Inhibitoren der HDAC-Klassen I, II und IV sind als innovative Antitumorwirkstoffe etabliert. Die Identifizierung von potenten und selektiven Inhibitoren von Sirtuinen (HDACs der Klasse III) könnte die komplexen biologischen Funktionen dieser Enzymklasse weiter aufklären und mögliche therapeutisch interessante Wirkstoffe hervorbringen.⁵³ Ausgewählte interessante Inhibitoren werden im Folgenden vorgestellt.

Sirtinol

In einem *high-throughput screening* (HTS) wurde der erste synthetische Inhibitor von Sirtuinen, das Sirtinol (**15a**), gefunden.⁵⁴ Sirtinol (**15a**) zeigt an SIRT2 einen IC_{50} -Wert von 38 μ M. Variationen an der benzamidischen Struktur und des Naphthylringes von **15a** führten zu Derivaten mit ähnlicher und leicht gesteigerter Potenz an SIRT1 und SIRT2.⁵⁵ Eine Behandlung von humanen Brustkrebs- und Lungenkrebszellen mit Sirtinol (**15a**) führte zu einem Seneszenz-ähnlichen Wachstumsarrest der Zellen. Zusätzlich wurde in den Zellen eine verminderte Aktivierung des Ras-MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Signaltransduktionsweges, der protoonkogene Eigenschaften hat, festgestellt.⁵⁶ Gambinol (**15b**), das Strukturähnlichkeit mit den Hydroxynaphthaldehyd-Derivaten wie **15a** aufweist, zeigt vergleichbare *in vitro*

Ergebnisse an beiden humanen Sirtuinen und wirkt in Tierversuchen antitumoraktiv.⁵⁷

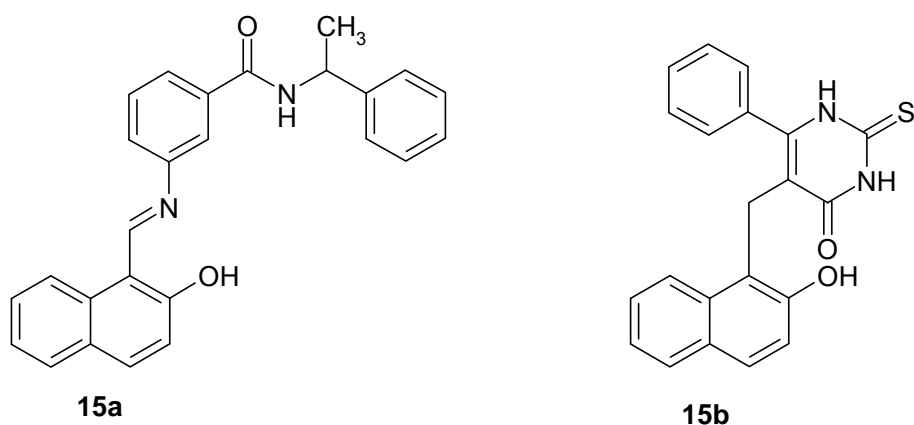


Abbildung 1-9: Strukturen von Sirtinol (**15a**) und Cambinol (**15b**)

Splitomicin und Derivate

Splitomicin (**16a**) wurde als Inhibitor von Hefe-Sirtuinen identifiziert. Eine Hemmwirkung an den humanen homologen Enzymen konnte mit dieser Substanz allerdings nicht erreicht werden.⁵⁸ Die Arbeitsgruppe um Jung stellte mit der Substanz HR73 (**16b**), einem Splitomicin-Derivat mit einem zusätzlichen Phenyl- und einem Bromsubstituenten, einen ersten selektiven und potenten Hemmstoff von SIRT1 her ($IC_{50} < 5 \mu M$).⁵³ Eine Substanzbibliothek unterschiedlich substituierter Splitomicin-Derivate wurde daraufhin synthetisiert. Aus den inhibitorischen Aktivitäten der einzelnen Derivate gegenüber den humanen Enzymen SIRT1 und SIRT2 konnten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs) abgeleitet werden und potente Inhibitoren im niedrig mikromolaren Bereich identifiziert werden.⁵⁹ So erwiesen sich β -substituierte Derivate wie **16c** und **16d** als günstig für eine inhibitorische Aktivität gegenüber SIRT2. Der Austausch des Lactons gegen ein analoges Lactam **16c** hatte keinen Wirkverlust zur Folge ($IC_{50} = 6 \mu M$). Das (*R*)-Enantiomer **16d** stellt mit einem IC_{50} von $1 \mu M$ das potenteste Splitomicin-Derivat an SIRT2 dar (Abbildung 1-10). Die SARs konnten durch Dockingstudien an bekannten SIRT2-Kristallstrukturen unterstützt werden.

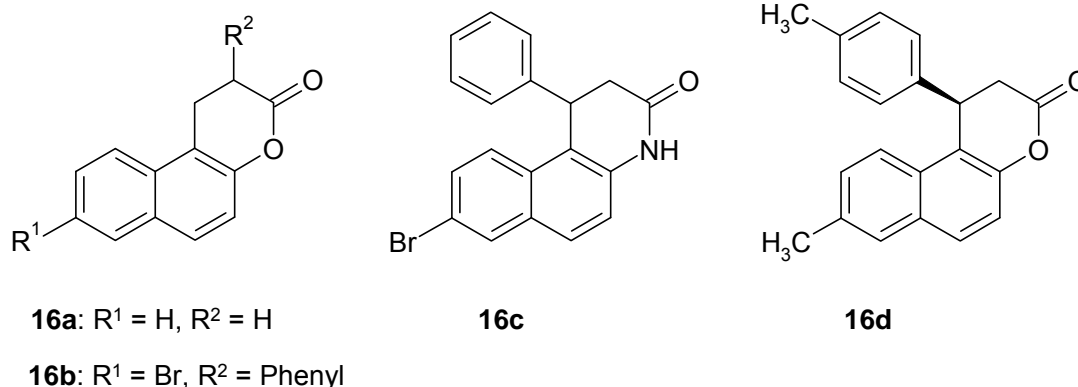
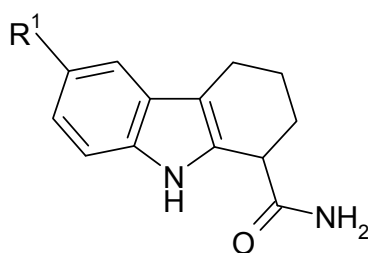


Abbildung 1-10: Splitomicin (**16a**) und aktive Derivate **16b-d**

Indole

In einem von der Firma Elixir Pharmaceuticals durchgeführten HTS wurden Indole der Struktur **17** (Abbildung 1-11) als potente und selektive Inhibitoren von SIRT2 mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich gefunden.⁶⁰ Das aktivste Derivat aus der Reihe, das 6-chlorsubstituierte Carbazol **17a** (EX-527) mit einem IC_{50} -Wert von 38 nM, steigerte die Acetylierung von p53 in verschiedenen Zellen mit vorangegangener DNA-Schädigung. Allerdings hatte eine Behandlung der Zellen mit **17a** keinen Einfluss auf das Überleben bzw. das Wachstum.⁶¹

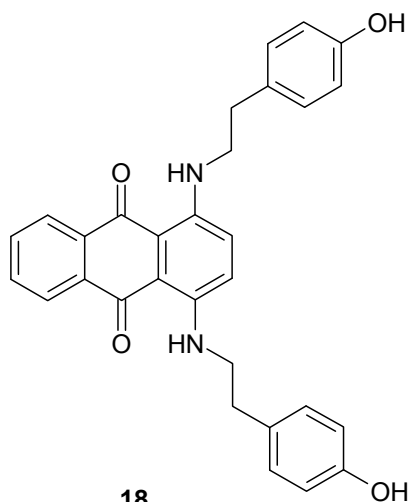


17a: $R^1 = Cl$

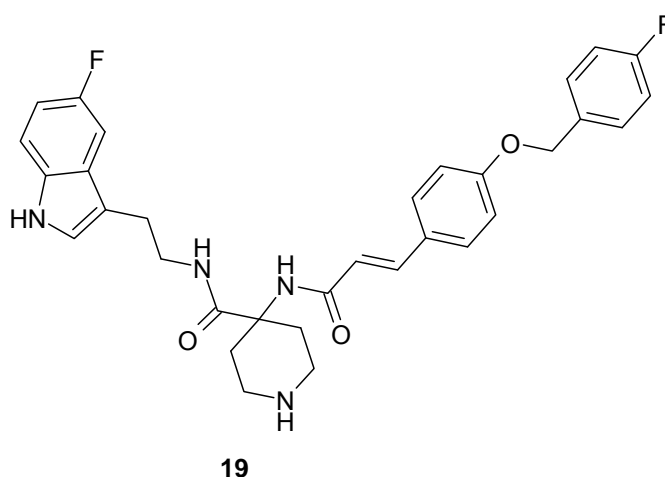
Abbildung 1-11: Struktur der Indole **17** der Firma Elixir Pharmaceuticals

Verschiedene

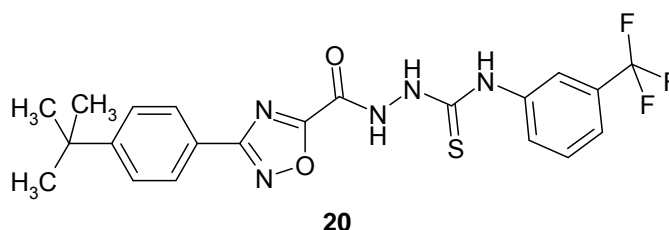
Die Arbeitsgruppe um Poso führte zur Identifizierung neuer Grundstrukturen von potentiellen Inhibitoren virtuelle Screenuntersuchungen durch. Verschiedene Strukturen wurden auf diesem Weg als Inhibitoren der Sirtuine im mikromolaren Bereich identifiziert. Exemplarisch werden einige dieser neuen Inhibitoren mit den dazugehörigen IC_{50} -Werten in Abbildung 1-12 vorgestellt.⁶²⁻⁶⁴



IC_{50} (SIRT2) = 56.7 μ M



IC_{50} (SIRT2) = 51 μ M



IC_{50} (SIRT1) = 192 μ M

IC_{50} (SIRT2) = 57 μ M

Abbildung 1-12: Strukturen verschiedener Sirtuin-Inhibitoren

Adenosinmimetika

Die Tatsache, dass bekannte Wirkstoffe, die Enzyme oder Rezeptoren mit adenosin-haltigen Liganden oder Cofaktoren inhibieren, auch in die Bindestelle des NAD^+ hineinpassen könnten, war Anlass für die Suche nach Adenosinmimetika. Enzyme, die ATP bzw. NAD^+ als Cofaktoren enthalten, sind z. B. Kinasen und NAD^+ -abhängige Dehydrogenasen. Die systematische Untersuchung einer Substanz-

bibliothek verschiedener Kinaseinhibitoren brachte potente Inhibitoren von Sirtuinen hervor. So gingen z. B. die Bis(indolyl)maleinimide **21** und das 5-Benzylkenpaullon **5a** als Inhibitoren von SIRT2 aus dieser Suche hervor. Bis(indolyl)maleinimide **21** wurden vor 20 Jahren ursprünglich als kompetitive Inhibitoren der Protein-Kinase C (PKC) identifiziert. Die getestete Reihe **21** ergab den aktivsten Vertreter **21a** mit IC_{50} -Werten von 3.4 μ M an SIRT1 und 0.8 μ M an SIRT2 (Abbildung 1-13).⁵³

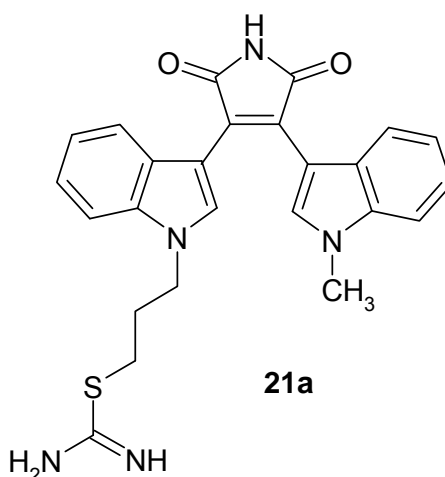


Abbildung 1-13: Aktivstes Derivat der Bis(indolyl)maleinimide **21a**

Paullone **3** sind Kinaseinhibitoren und zeigen inhibitorische Aktivität gegenüber der NAD^+ -abhängigen Dehydrogenase mMDH (Kapitel 1.2.3). Sie wurden aus diesen Gründen der zu untersuchenden Substanzbibliothek beigelegt. Außerdem haben Paullone das Strukturelement Indol mit den potenten Inhibitoren **17** und **21** gemeinsam. Kenpaullon (**3a**) selbst zeigt an SIRT2 nur eine schwache Potenz mit einem IC_{50} -Wert von ungefähr 100 μ M. Wird der Lactam-Stickstoff von **3a** allerdings benzyliert, bewirkt die daraus resultierende Verbindung **5a** eine mit dem bekannten Inhibitor Sirtinol (**15a**) vergleichbare Inhibition an SIRT 2 (IC_{50} = 42.8 μ M). Gleichzeitig wird ihre kinaseinhibitorische Aktivität gegenüber **3a** deutlich abgeschwächt.³⁰ Die Benzylierung am Lactam-Stickstoff verschiebt also das Selektivitätsprofil von Kinaseinhibitoren hin zu Inhibitoren NAD^+ -abhängiger Enzyme und macht diese Stoffklasse zu interessanten potentiellen Inhibitoren der mMDH und humaner Sirtuine.

2 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten potente Inhibitoren der NAD^+ -abhängigen mitochondrialen Malatdehydrogenase synthetisiert und auf ihre inhibitorische Aktivität überprüft werden. Für die Testungen wurde ein im Arbeitskreis Kunick etabliertes photometrisches Testsystem verwendet. Aus den Ergebnissen der einzelnen Verbindungen sollten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hergeleitet werden. Besonders aktive Vertreter wurden am National Cancer Institut (NCI) auf ihre antiproliferative Aktivität gegenüber humanen Krebszelllinien getestet. Im Folgenden werden die verschiedenen Stoffklassen vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt werden sollten. Ausgehend von Paullonen **3** sollte zum einen eine Substanzbibliothek von selektiv am Lactam-Stickstoff substituierten Derivaten **5** synthetisiert und zum anderen die Verbindungsklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** durch oxidative Ringverengung erschlossen werden (Abbildung 2-1).

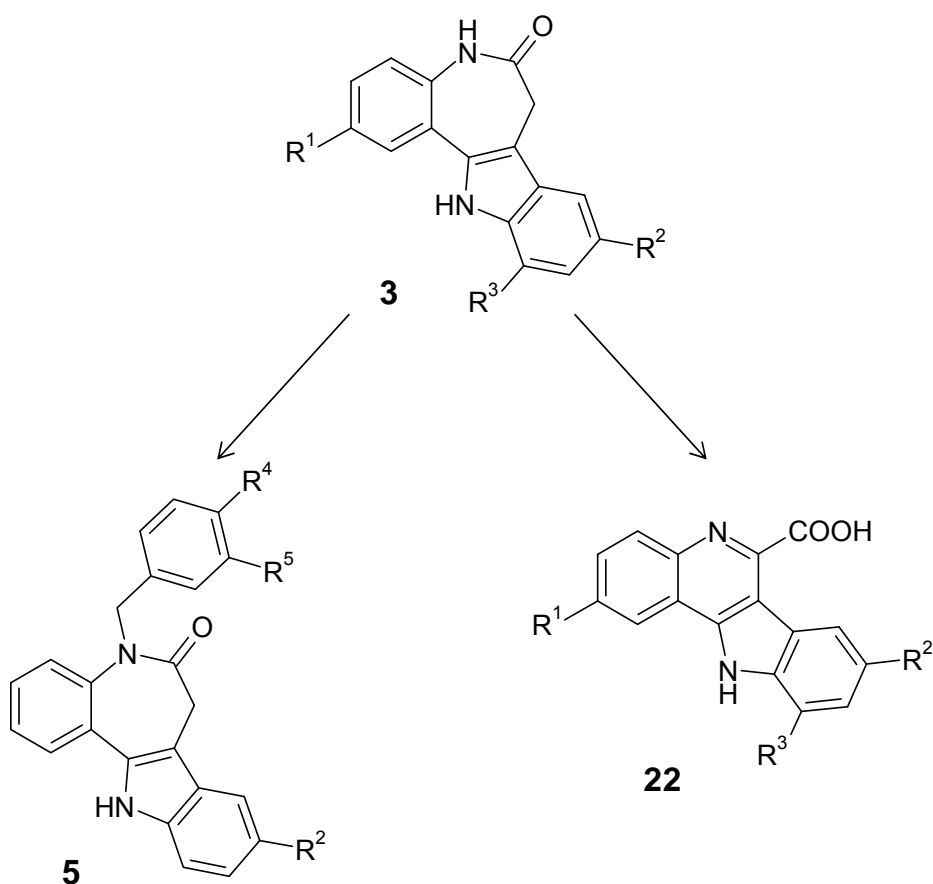
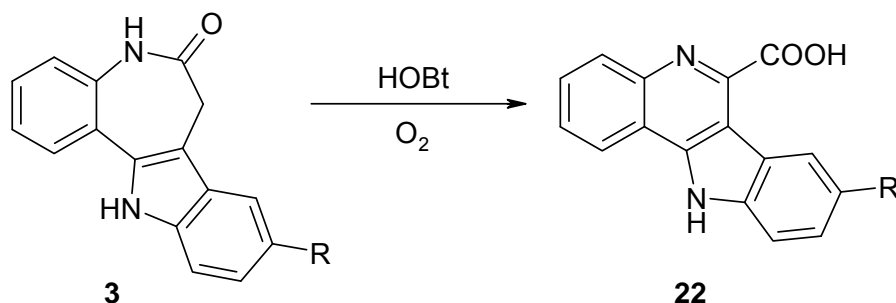


Abbildung 2-1: Geplante neue Stoffklassen **5** und **22** aus Paullonen **3**

Kohfeld zeigte, dass eine selektive Benzylierung des Kenpaullons am Lactam-Stickstoff zu einer hohen inhibitorischen Potenz der Verbindung **5a** gegenüber der mitochondrialen Malatdehydrogenase führt. Gleichzeitig verliert die Substanz weitgehend ihre Hemmaktivität am CDK1/Cyclin B-Komplex. So zeigt Kenpaullon (**3a**) einen IC_{50} -Wert von $0.4 \mu M$ und sein benzyliertes Derivat **5a** nur noch einen IC_{50} -Wert von $35 \mu M$ an CDK1/Cyclin B.³⁰

Pies⁶⁵ stellte in ihren Untersuchungen zur Darstellung von 9-Carboxamid-substituierten 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-onen (Paullonen, **3**) fest, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen (*N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt)/EDC) eine Ringkontraktion des siebengliedrigen Benzazepinon-Ringgerüsts zu einem aromatischen Chinolinsystem stattfindet. *N*-Hydroxybenzotriazol kann mit Luft-sauerstoff leicht das Benzotriazol-*N*-oxyl-Radikal (BTNO) bilden. Da bei Verwendung einer Stickstoff-Atmosphäre keine Umlagerung des Paullons **3** stattfand, wird eine radikalische Initiation dieser Umlagerung vermutet (Schema 2-1).



Schema 2-1: Umlagerung der Paullone **3** zu 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22**

Für die von Pies entdeckte neue heterozyklische Stoffklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Syntheseverfahren etabliert werden, das eine schnelle und effiziente Darstellung ermöglicht. Aufgrund der Strukturverwandtschaft der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** mit den von Baker und Bramhill veröffentlichten Chinolincarbonsäuren **1**, die potente Inhibitoren der mMDH sind, stellen **22** eine Klasse potentieller neuer Inhibitoren der

mMDH dar. Untersuchungen zu Zwischenprodukten der Umlagerungsreaktion sollten außerdem Aussagen zu einem möglichen Reaktionsmechanismus liefern.

Die Arbeitsgruppe von Laurent Meijer (Station Biologique Roscoff, Bretagne, Frankreich) sollte Testungen der neu synthetisierten Verbindungen **5** und **22** an verschiedenen Kinasen durchführen und die Selektivität der Verbindungen gegenüber NAD^+ -abhängigen Enzymen bekräftigen. Ausgewählte Vertreter beider Stoffklassen wurden von unserem Kooperationspartner Manfred Jung in Freiburg an humanen Sirtuinen SIRT1 und SIRT2 getestet. Sirtuine sind in ihrem Katalysiemechanismus wie die mMDH von dem Cofaktor NAD^+ abhängig und stellen mit ihren diversen biologischen Funktionen sehr interessante neue Zielstrukturen dar.

Die kommerziell erworbenen Chinolin-2-carbonsäuren **23-27** sollten ebenfalls auf ihre mMDH-inhibitorische Aktivität überprüft werden, um auch aus diesen Ergebnissen mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abzuleiten (Abbildung 2-2).

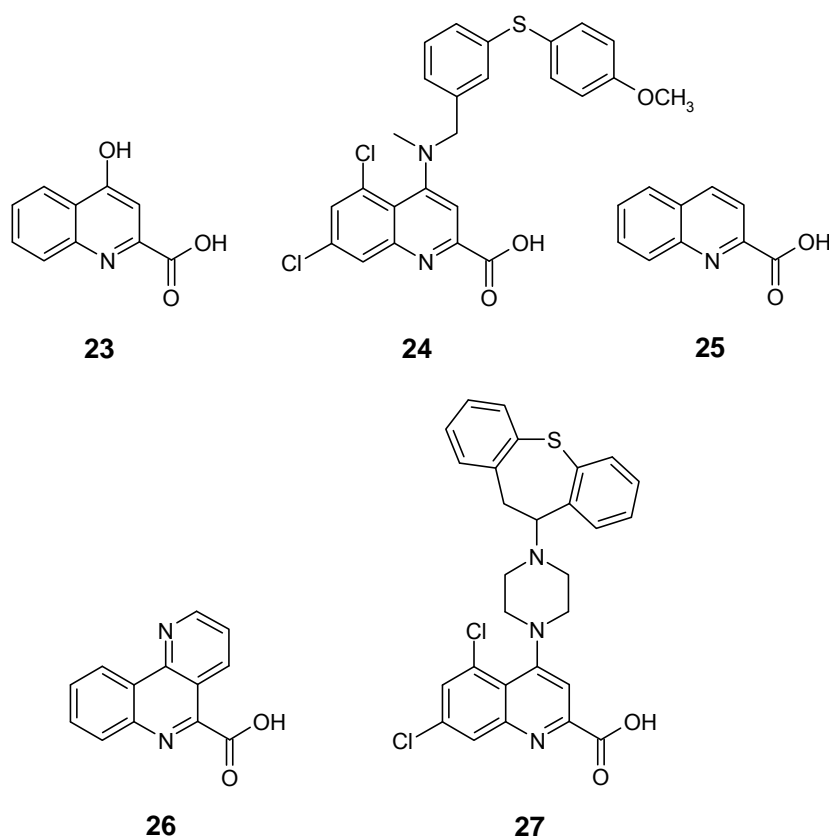


Abbildung 2-2: Kommerziell erworbene potentielle Inhibitoren der mMDH **23-27**

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Synthese verschiedener Anilinochinoline **28** und dazu analoger Chinolin-2-carbonsäuren **29**. Auch Verbindungen der allgemeinen Struktur **30** als decarboxylierte Analoga der Stoffklasse **22** sollten erschlossen werden (Abbildung 2-3). Aus den Ergebnissen der Testungen dieser Verbindungen an der mMDH sollte abgeleitet werden, ob das Vorhandensein der Carboxylfunktion essentiell für die Wirkung am Enzym ist und damit als Pharmakophor unbedingt vorhanden sein muss.

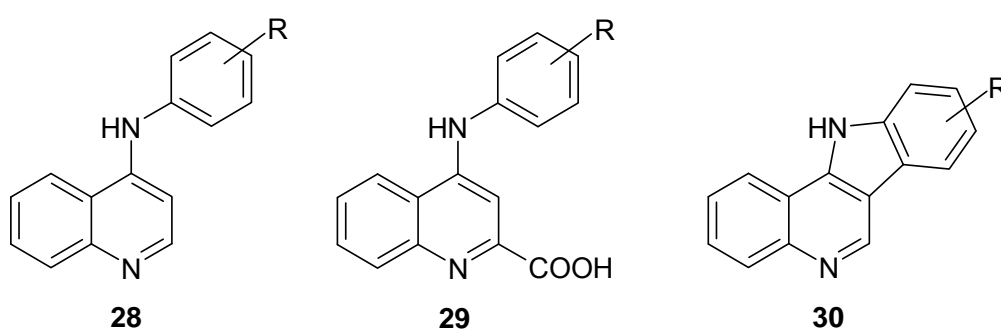
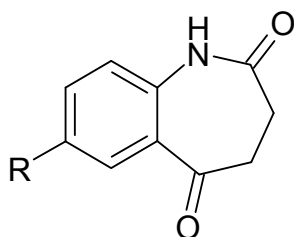


Abbildung 2-3: Angestrebte Strukturen **28-30**

3 Synthesen

Für die beiden wichtigsten Stoffklassen, die im Rahmen dieser Arbeit erschlossen werden sollten, wurden unterschiedlich substituierte Paullone **3** als gemeinsame Ausgangsverbindungen benötigt. Für die Synthese der 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-one **3** wurden 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) und 7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**) (Abbildung 3-1) sowie kommerziell zu erwerbende Phenylhydrazine als Edukte eingesetzt. Die Synthese der Paullone **3** wird in Kapitel 3.2 erläutert.



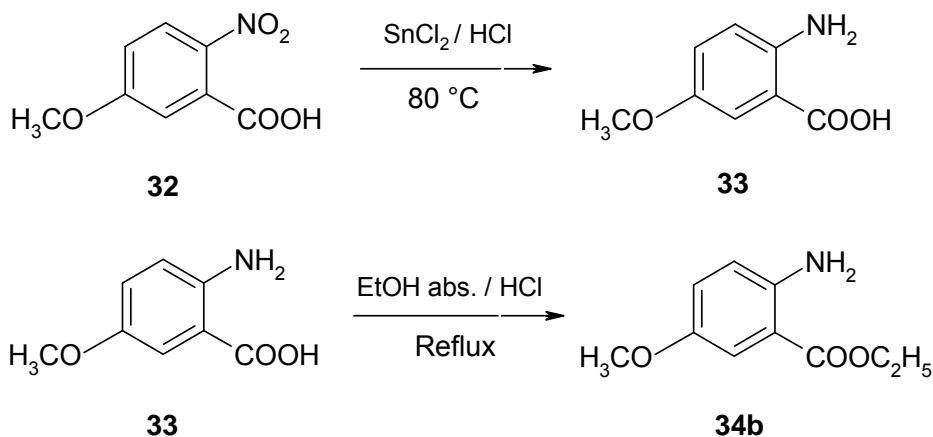
31a (R = H)

31b (R = OCH₃)

Abbildung 3-1: Struktur der Benzazepindione **31a** und **31b**

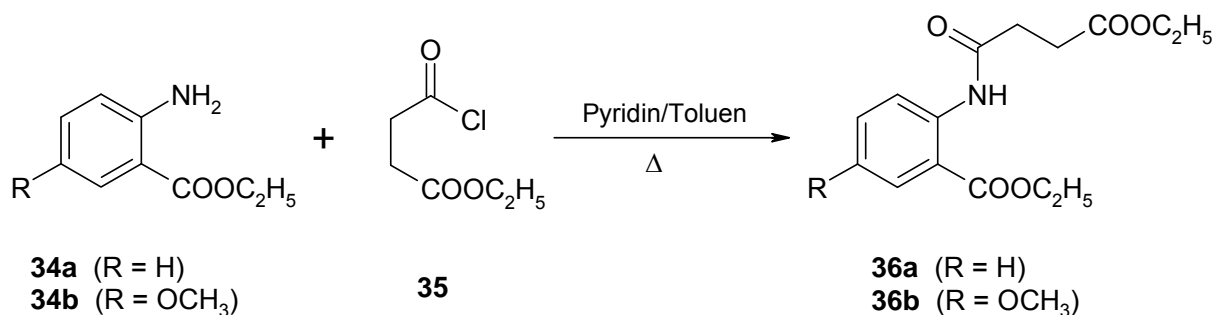
3.1 Synthese der 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione

Die Nitrogruppe der 5-Methoxy-2-nitrobenzoesäure (**32**) wurde in einem ersten Reaktionsschritt in Anwesenheit von Zinn(II)-chlorid im salzsauren Medium nach Smith zur freien Aminogruppe reduziert.⁶⁶ Die nachfolgende Veresterung der entstandenen 5-Methoxyanthranilsäure (**33**) zu 2-Amino-5-methoxybenzoesäure-ethylester (**34b**) erfolgte nach einer von Schultz⁶⁷ beschriebenen Methode durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas in die ethanolische Lösung (Schema 3-1).



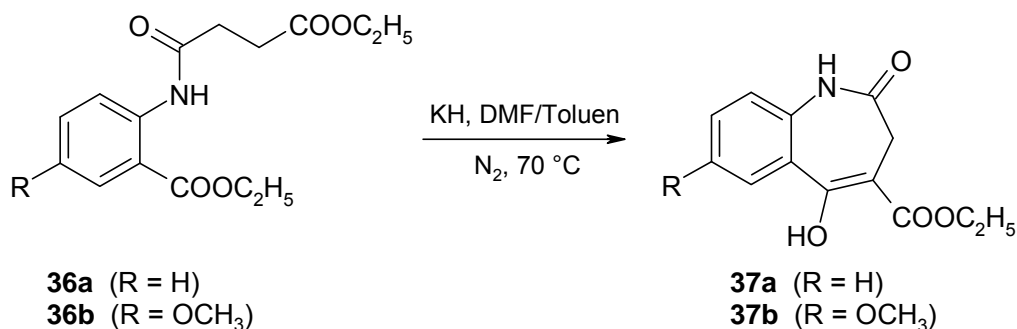
Schema 3-1: Reduktion der 5-Methoxy-2-nitrobenzoesäure (**32**) und anschließende Veresterung der 5-Methoxyanthranilsäure (**33**)

Anschließend wurden die Anthranilsäureester **34a** und **34b** mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**35**) nach einer von Kunick⁶⁸ erstmals beschriebenen und von Link⁶⁹ modifizierten Methode unter Zusatz von Pyridin zu den entsprechenden 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]benzoesäureethylestern **36a** und **36b** umgesetzt (Schema 3-2).



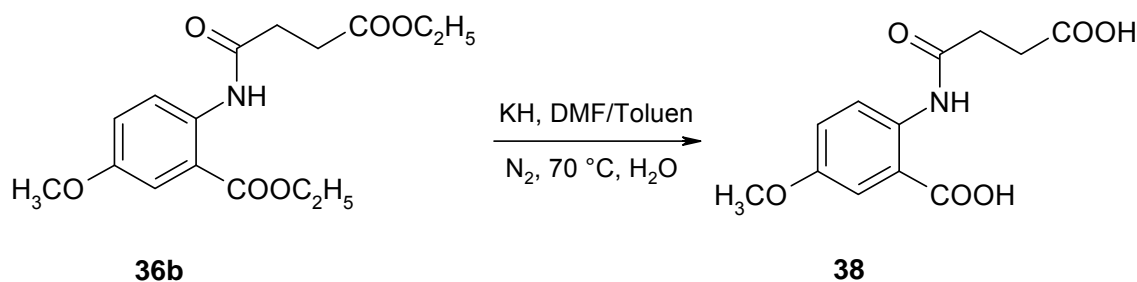
Schema 3-2: Umsetzung der Anthranilsäureester **34** mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**35**)

Der anschließende Ringschluss zu den 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylestern **37a** und **37b** erfolgte durch eine Umsetzung mit Kaliumhydrid unter Stickstoff-Atmosphäre im Rahmen einer Dieckmann-Esterkondensation (Schema 3-3).



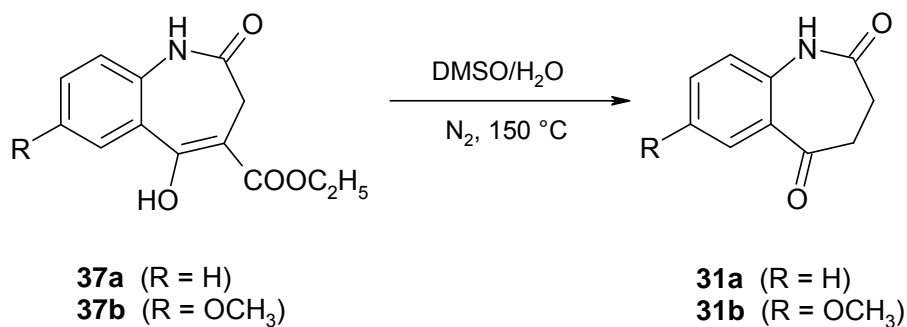
Schema 3-3: Ringschluss durch eine Dieckmann-Esterkondensation

Bei der Umsetzung zu **37b** entstand bei einem Reaktionsansatz ein unerwartetes Produkt, ein gelbes Pulver, dessen ¹H-NMR-Spektrum eindeutig zeigte, dass kein Ringschluss stattgefunden haben konnte. Das IR-Spektrum mit einem „Säurebauch“ zwischen 2500 und 3000 cm⁻¹ ließ auf eine Carbonsäure schließen. Die Vermutung, dass durch Wasser im Reaktionsansatz die beiden Estergruppen hydrolysiert worden waren, ließ sich durch eine richtige Elementaranalyse von 2-[(3-Carboxypropanoyl)-amino]-5-methoxybenzoesäure (**38**) beweisen (Schema 3-4).



Schema 3-4: Hydrolyse der Estergruppen von **36b**

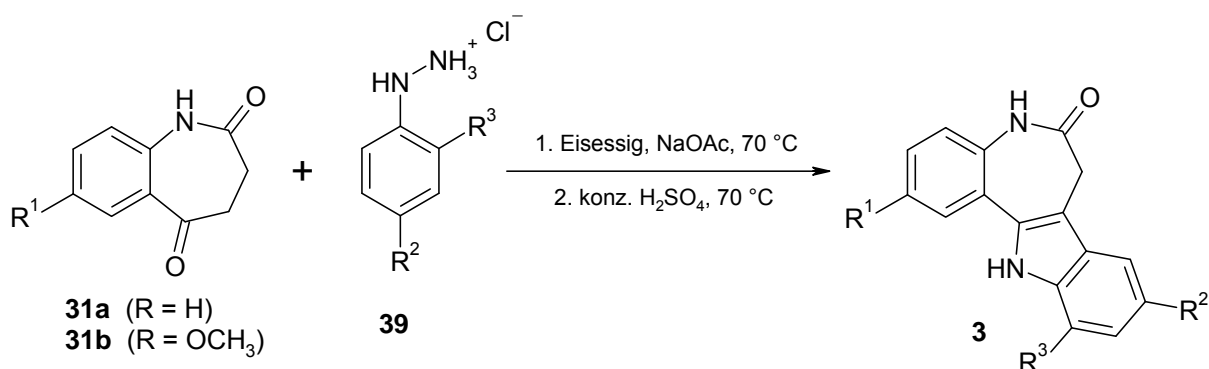
Durch Erhitzen der Verbindungen **37a** und **37b** in wasserhaltigem Dimethylsulfoxid auf 150 °C wurden die Verbindungen zu den gewünschten Produkten 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) und 7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**) dealkoxycarbonyliert (Schema 3-5).



Schema 3-5: Dealkoxycarbonylierung zu den 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionen **31**

3.2 Darstellung von Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen durch Fischer-Indol-Synthese

Die Umsetzung der Benzazepindione **31a** und **31b** mit unterschiedlich substituierten Phenylhydrazinen **39** (bzw. Phenylhydrazinhydrochloriden unter Zusatz äquimolarer Mengen Natriumacetat) in Eisessig unter Zusatz katalytischer Mengen an konzentrierter Schwefelsäure führte ohne Isolierung der Zwischenstufe der Hydrazone in einer Fischer-Indol-Synthese direkt zu den ringgeschlossenen Indolo[3,2-*d*][1]-benzazepinonen **3** (Schema 3-6, Tabelle 3-1).⁷⁰



Schema 3-6: Darstellung von Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen **3**

Tabelle 3-1: Dargestellte Paullone **3a-o**

3	R^1	R^2	R^3
a	H	Br	H
b	H	Cl	H
c	H	H	H
d	H	$C(CH_3)_3$	H
e	H	CF_3	H
f	H	CH_3	H
g	H	OCH_3	H
h	H	NO_2	H
i	H	$COOH$	H
j	H	H	Br
k	H	H	Cl
l	OCH_3	$C(CH_3)_3$	H
m	OCH_3	Cl	H
n	OCH_3	CF_3	H
o	OCH_3	$COOH$	H

Die zur Synthese der Chinolincarbonsäuren **22p**, **22q**, **22r** und **22s** verwendeten 2-iodsubstituierten Paullone **3p**, **3q**, **3r** und **3s** wurden von Reichwald synthetisiert und zur Verfügung gestellt.⁷¹

3.3 Synthese der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one

Die selektive Alkylierung von Paullonen ist aufgrund der Anwesenheit zweier reaktiver Zentren, zweier deprotonierbarer Stickstoffatome, nicht trivial.

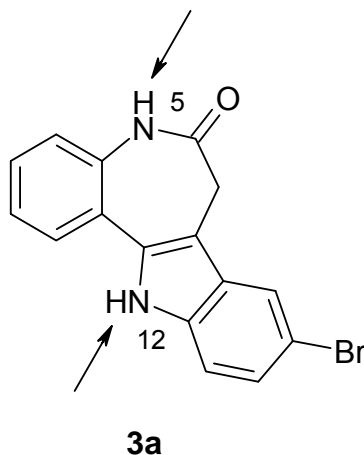
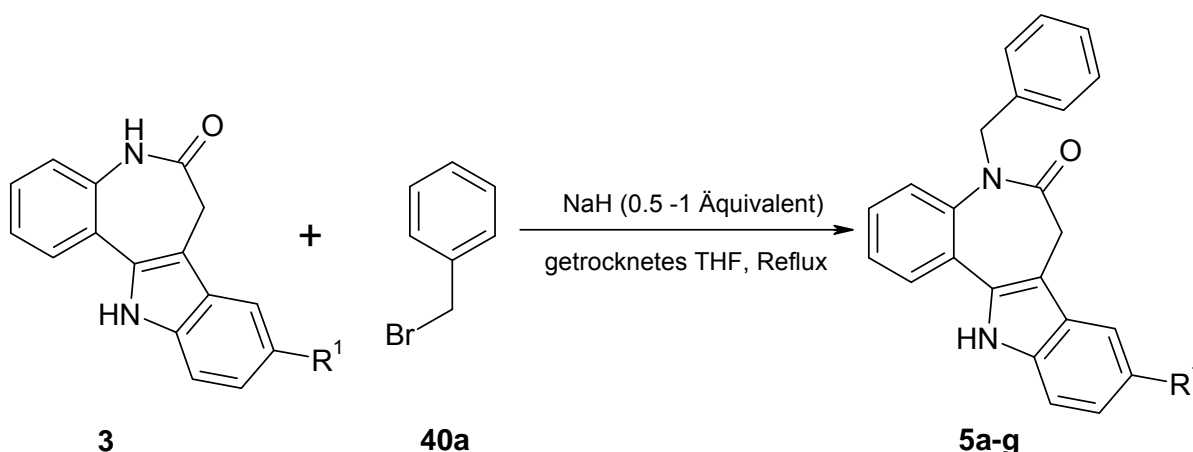


Abbildung 3-2: Alkylierbare Positionen am Beispiel von Kenpaullon (**3a**)

Schultz beschäftigte sich mit der selektiven Alkylierung am Lactam- oder am Indol-Stickstoff. Sie untersuchte verschiedene Reaktionsbedingungen, indem sie die verwendeten Basen und Lösungsmittel variierte. Für eine selektive Alkylierung am Lactam-Stickstoff erwies sich die Kombination aus Natriumhydrid und getrocknetem Tetrahydrofuran als optimal. Schultz konnte unter diesen Bedingungen 93% des gewünschten, am Lactam alkylierten Kenpaullons **5a** und 7% Edukt, Kenpaullon (**3a**), isolieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diverse Paullone mit unterschiedlichen Benzylbromiden alkyliert werden. Die von Schultz verwendeten Reaktionsbedingungen konnten nicht vollständig reproduziert werden, so dass weitere Optimierungsschritte der Reaktion nötig waren, um die gewünschten Produkte **5** in zufriedenstellender Reinheit darstellen zu können. Schultz erhitzte äquimolare Mengen Paullon **3** und Natriumhydrid in getrocknetem Tetrahydrofuran für 45 Minuten zum Rückfluss und gab anschließend 1.5 Äquivalente Benzylbromid (**40a**) hinzu.⁶⁷ Die gewünschte Deprotonierung des Lactams mit einer äquimolaren Menge Natriumhydrid gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig, so dass das nicht-benzylierte Paullon **3** nach Zugabe einer äquimolaren Menge Benzylbromid auf dem Dünnschichtchromatogramm noch detektiert werden konnte. Außerdem entstanden nach Zugabe von Benzylbromid zwei neue Produktflecke mit sehr ähnlichen R_f -

Werten auf dem Dünnschichtchromatogramm. NMR-Spektren der Gemische aus erstem und zweitem Produktfleck zeigten, dass der zweite Produktfleck wahrscheinlich dem unerwünschten dibenzylierten Paullon entspricht, welches sowohl am Lactam- als auch am Indol-Stickstoff einen Benzylsubstituenten trägt. Die Produktgemische mussten säulenchromatographisch aufgetrennt werden. Aufgrund deutlich unterschiedlicher R_f -Werte ließ sich das Edukt **3** problemlos von dem gewünschten Produkt, 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on **5**, abtrennen. Problematisch dagegen war die säulenchromatographische Trennung des mono- und des dibenzylierten Produktes, die sehr ähnlichen R_f -Werte aufwiesen. Durch variierende Mengen Natriumhydrid (0.5 Äquivalente - 1 Äquivalent) bei jedem individuellen Paullon konnte die unerwünschte Dibenzylierung in den meisten Fällen unterdrückt werden. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Abtrennung des Eduktes und der Nebenprodukte mussten einige Verbindungen **5** zusätzlich durch Umkristallisation gereinigt werden.

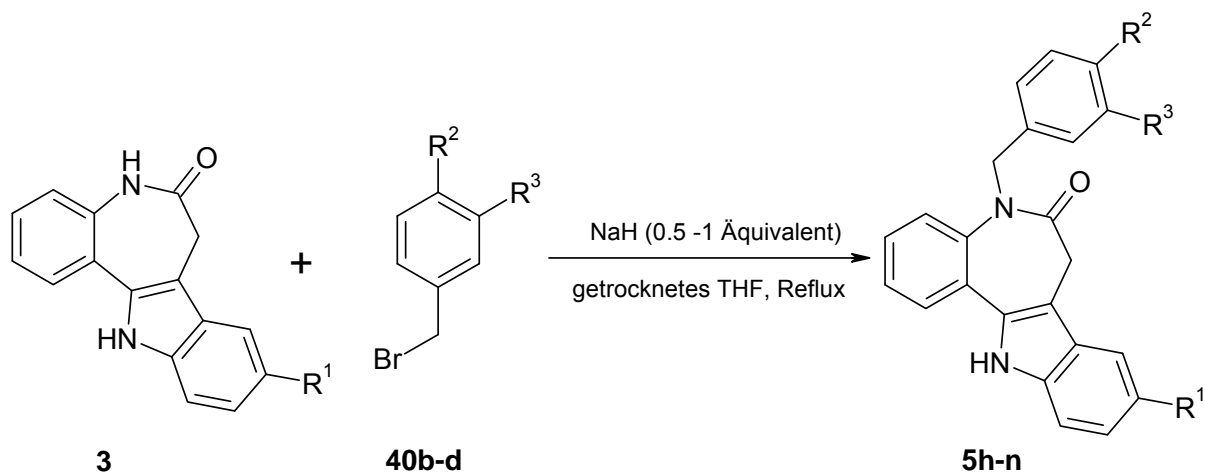


Schema 3-7: Selektive Alkylierung von Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen **3** mit Benzylbromid (**40a**)

Zunächst wurden 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one mit verschiedenen Resten in Position 9 des Paullongrundkörpers synthetisiert (Schema 3-7, **5a-g**). Alle Verbindungen sollten an der mMDH auf ihre inhibitorische Aktivität überprüft werden. Es sollte untersucht werden, ob ein spezieller Substituent in dieser

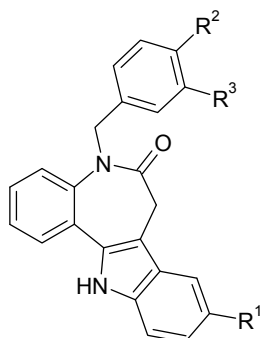
Position eine besonders gute inhibitorische Aktivität der resultierenden Verbindung bewirkt (Kapitel 4.1.2).

Im nächsten Schritt sollte der Benzylrest durch verschiedene Substituenten am aromatischen Kern verändert werden. Topliss hat ein Schema für die systematische Variation aromatischer Substituenten zur Optimierung der biologischen Wirkung von Inhibitoren ausgearbeitet.⁷² Wasserstoff wird z. B. gegen einen Chlorsubstituenten ausgetauscht. Bewirkt die Einführung dieses elektronenziehenden Substituenten eine Wirksteigerung, so werden nun Substituenten mit stärkeren elektronenziehenden Eigenschaften oder mehrere dieser Substituenten eingeführt. Es sollten nach dem Schema von Topliss Benzylbromide mit den Resten 4-Methyl, 4-Methoxy, 4-Chlor und 3,4-Dichlor verwendet werden (Schema 3-8).⁷³



Schema 3-8: Selektive Alkylierung von Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen **3** mit Benzylbromiden **40b-d**

Tabelle 3-2: 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **5a-n**



5	R¹	R²	R³
a	Br	H	H
b	Cl	H	H
c	H	H	H
d	C(CH ₃) ₃	H	H
e	CF ₃	H	H
f	CH ₃	H	H
g	OCH ₃	H	H
h	Br	CH ₃	H
i	Br	OCH ₃	H
j	Br	Cl	H
k	Br	Cl	Cl
l	H	CH ₃	H
m	H	Cl	Cl
n	C(CH ₃) ₃	Cl	Cl

3.3.1 Besonderheiten in den NMR-Spektren der 5-Benzyl-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one

Der Benzazepinonring der Paullone liegt in Wannenform vor. Dieser Siebenring kann durch Umklappen in zwei verschiedenen chiralen Konformationen (Abbildung 3-3) vorliegen.⁷⁴ In Analogie zu 1,4-Benzazepin-2-onen, wie z. B. Diazepam, liegt hier eine helikale Chiralität vor.^{75, 76} Im Fall der am Indol- und Lactam-Stickstoff unsubstituierten Paullone **3** ist die Ringinversion der beiden Konformere durch eine niedrige

Energiebarriere nicht eingeschränkt und kann sehr schnell ablaufen. Die beiden Protonen der azepinischen CH₂-Gruppe sind durch die innermolekulare Beweglichkeit chemisch äquivalent und zeigen im ¹H-NMR-Spektrum ein Singulett.⁷⁷

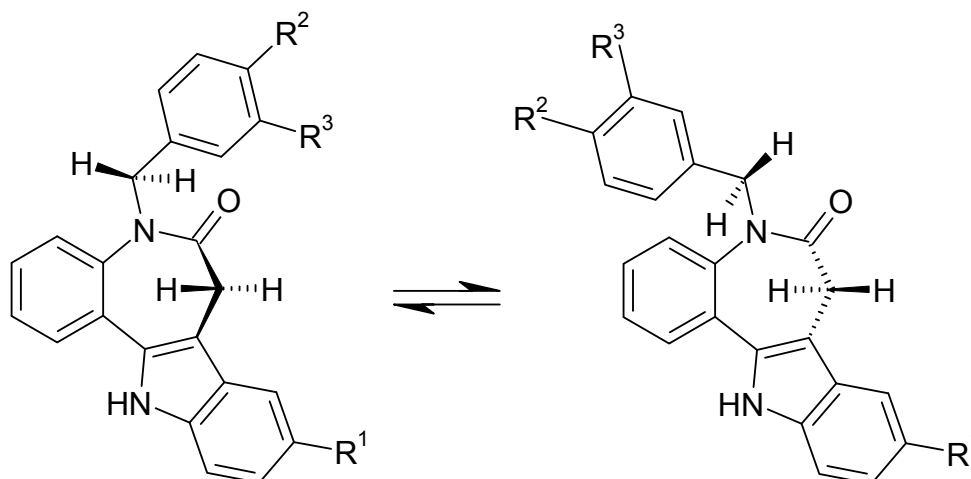
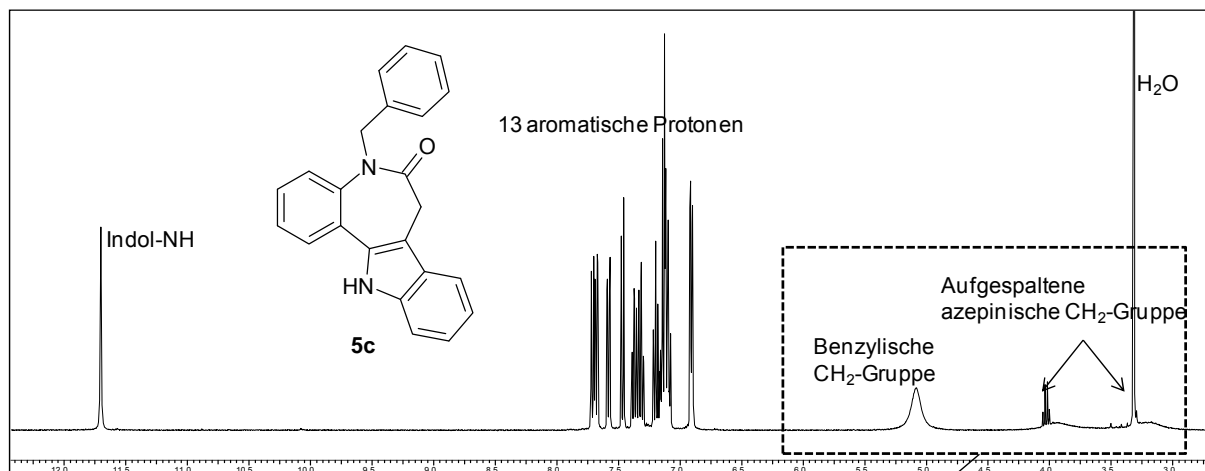


Abbildung 3-3: Ringinversion von Benzylpaullonen **5**

Die Benzylierung am Lactam-Stickstoff führt zu einer Erhöhung der Energiebarriere und damit zu einer eingeschränkten Umwandlung zwischen den beiden Konformationen des Benzazepinonrings. Diese läuft, gemessen an der NMR-Zeitskala, so langsam ab, dass die enantiotopen Methylenprotonen des Azepinrings chemisch inäquivalent werden und deshalb aufgespaltene Signale zeigen. Da nahe der Koaleszenztemperatur gemessen wurde, ergaben sich im 400 MHz- und im 600 MHz-Spektrum nicht zwei scharfe Dubletts, sondern zwei verbreiterte Singulett (Abbildung 3-4).

Durch die eingeschränkte langsame Ringinversion des Benzazepinonrings werden die vorher enantiotopen Protonen der benzyllischen CH₂-Gruppe diastereotop. Diastereotope Kerne sind anisochron, koppeln miteinander und spalten ebenfalls auf. Im 400 MHz-Spektrum ist ein breites Singulett bei 5.08 ppm zu erkennen. Mit zunehmender Betriebsfrequenz steigt auch der Wert für die Koaleszenztemperatur einer Signalgruppe. Wird also bei 600 MHz statt bei 400 MHz gemessen, entfernt man sich von der Koaleszenztemperatur,⁷⁸ und zwei unaufgelöste Dubletts für die beiden Protonen sind zu erkennen (Abbildung 3-4).

^1H -NMR Spektrum bei 400 MHz



Ausschnitt des Spektrums bei 600 MHz

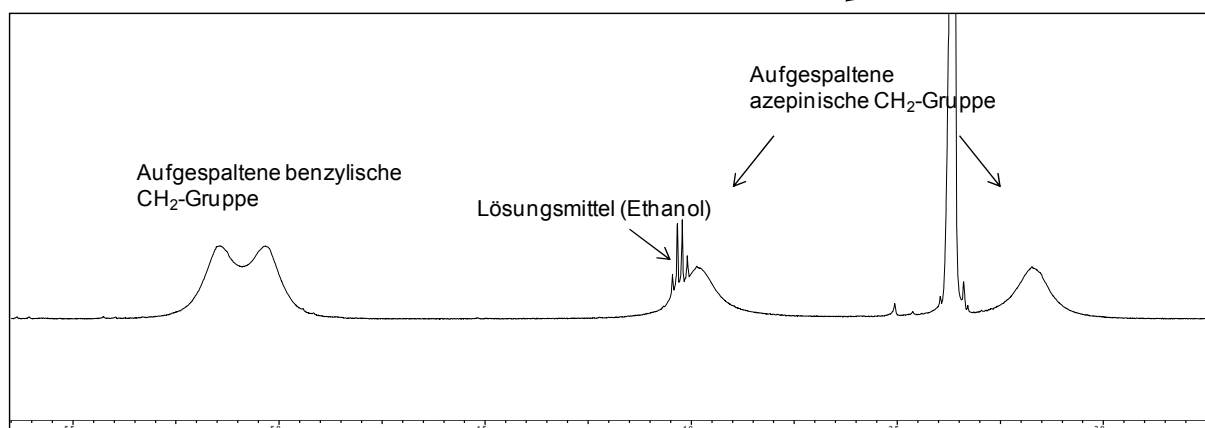
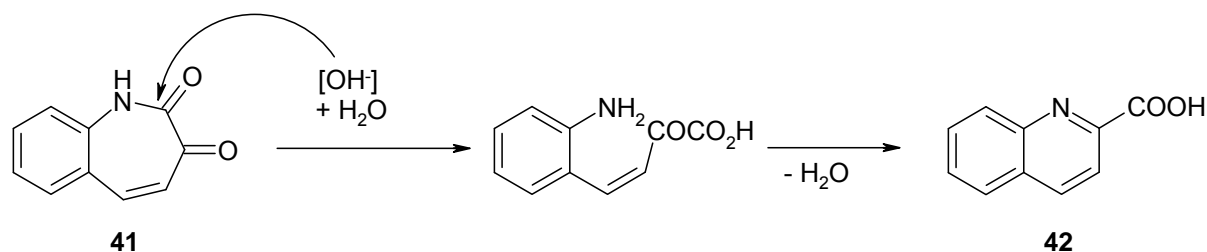


Abbildung 3-4: ^1H -NMR Spektrum der Verbindung **5c** bei verschiedenen Messfrequenzen (400 und 600 MHz)

3.4 Ringverengung von Paullonen

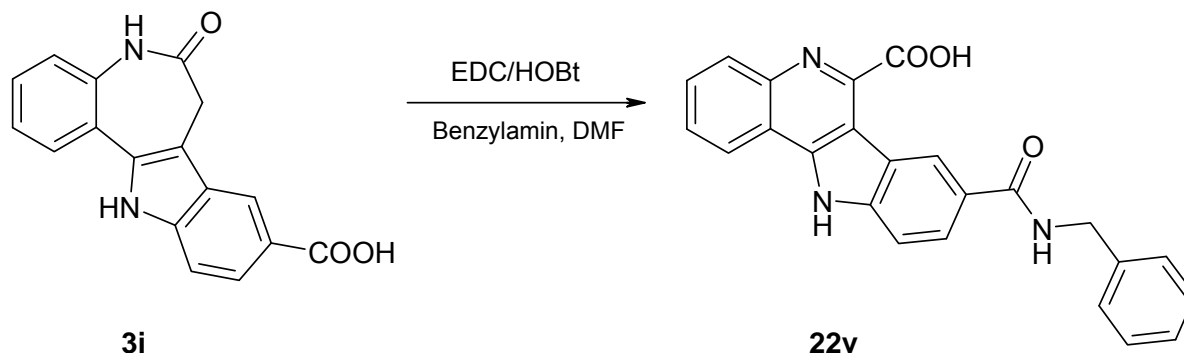
Im Rahmen der Dissertation von Pies⁶⁵ sollten Paullonderivate dargestellt werden, die in der Position 9 des 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on-Grundkörpers eine Carbonsäureamidfunktion aufweisen. Für die Synthese dieser Amide wurde die Reagentienkombination aus EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino)propylcarbodiimid) und HOBt (1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol) gewählt. Bei einigen dieser Reaktionen wurden unbekannte Produkte isoliert, die kein für Paullone typisches Signal für die azepinische CH₂-Gruppe des Siebenringes im ¹H-NMR-Spektrum mehr aufwiesen. Das Fehlen dieses charakteristischen Signals deutete auf grundlegende Veränderungen des Benzazepinon-Ringgerüsts während der Reaktion hin. In der Literatur gibt es mehrere Veröffentlichungen, die über Ringkontraktionen von Benzazepindion-Derivaten zu Chinolincarbonsäuren berichten.^{79, 80} So synthetisierten Jones und Mitarbeiter die Chinolin-2-carbonsäure (**42**) durch Behandlung von 1*H*-1-Benzazepin-2,3-dion (**41**) mit warmer Alkalilauge (Schema 3-9).



Schema 3-9: Ringverengung des 1*H*-1-Benzazepin-2,3-dions (**41**) zur Chinolin-2-carbonsäure (**42**)

Überträgt man diese Umlagerung auf den Benzazepinonring der Paullone **3**, lassen sich 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** als Reaktionsprodukte postulieren. Das Fehlen der ¹H-NMR-Signale für die Protonen der azepinischen CH₂-Gruppe und des Lactam-Stickstoffs, das hinzugekommene Signal im tiefen Feld bei ca. 13 ppm sowie das Vorhandensein von sieben aromatischen Protonen unterstützen die postulierte Struktur **22**. Die Bildung des unbekannten Nebenproduktes wurde zum ersten Mal bei der Umsetzung von 6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonsäure (**3i**) mit Benzylamin unter den oben genannten Reaktionsbedingungen beobachtet (Schema 3-10). Die Struktur von **22v** konnte von

Pies mit diversen analytischen Verfahren (NMR, Elementaranalyse, UV, IR, HRMS) eindeutig belegt werden und die Synthese unter den dargestellten Bedingungen auch auf Kenpaullon (**3a**) übertragen werden.



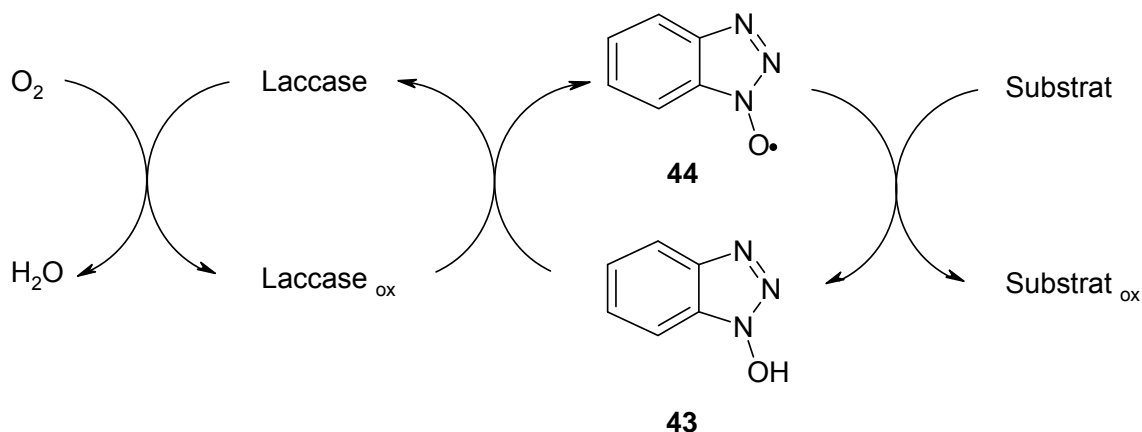
Schema 3-10: Umlagerung des Indolo[3,2-d][1]benzazepinons **3i** ⁶⁵

Um herauszufinden, welche Reagentien die Ringverengungsreaktion provozieren, variierte Pies die Reaktionsbedingungen. Sie fand heraus, dass *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Reagenz ohne Zusatz von EDC zu einer Umlagerung führt. Die Reaktion des Paullons **3** nur in Anwesenheit von EDC führte nicht zu einer Umsetzung zur Chinolincarbonsäure **22**. Die Reaktionsdauer bei Raumtemperatur an der Luft ist ein weiterer kritischer Parameter der Reaktion. Eine lange Reaktionsdauer führte zur Isolierung der Chinolincarbonsäure **22** als Hauptkomponente. Wurde die Reaktion schneller abgebrochen, wurde das Edukt **3** zum Teil mit isoliert. Pies führte die Reaktion unter Stickstoff-Atmosphäre durch und konnte nur das eingesetzte Paullon **3** wieder isolieren. Daraus folgt, dass die Anwesenheit von Sauerstoff essentiell für die Reaktion ist. Der initiale Schritt zur Ringverengung ist eine Oxidation.

Oxidationen mit *N*-Hydroxybenzotriazol werden in der Literatur oft bei enzymatisch und elektrochemisch katalysierten Reaktionen erwähnt. Die Literaturbeispiele werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

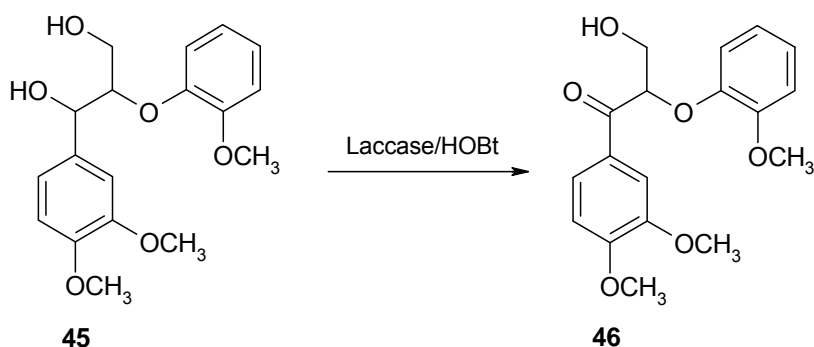
3.4.1 Oxidationen mit *N*-Hydroxybenzotriazol und anderen Oxidationsmitteln

Xu und Mitarbeiter^{81, 82} beschreiben in ihren Veröffentlichungen den Einsatz von *N*-Hydroxybenzotriazol als Mediator in Laccase-katalysierten oxidativen Biotransformationen. Laccasen sind kupferhaltige Oxidoreduktasen. Die Laccase oxidiert den Laccase Mediator, in diesem Fall *N*-Hydroxybenzotriazol (**43**). Die oxidierte Form des Mediators, das Benzotriazol-*N*-oxyl-Radikal (**44**), oxidiert das eigentliche Substrat und wird dabei selbst in seine ursprüngliche Form zurück reduziert. Der dargestellte Kreislauf kann erneut beginnen (Schema 3-11). Als Mediator kann auch *N*-Hydroxyphthalimid fungieren.⁸³



Schema 3-11: Laccase-*N*-Hydroxybenzotriazol-Redoxsystem⁸¹

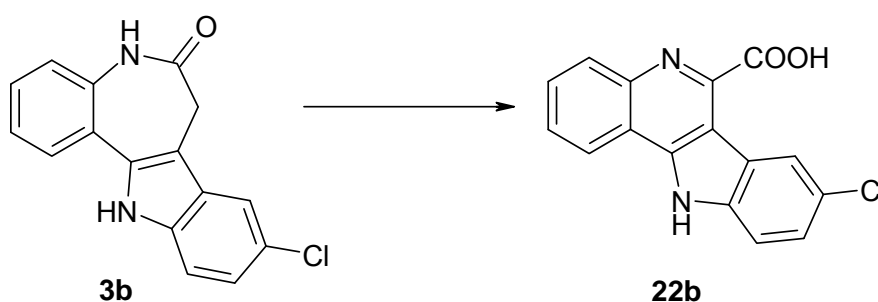
Die Arbeitsgruppe um Li⁸⁴ beschreibt die Funktion von HOBt (**43**) in dem Laccase/HOBt Redoxsystem bei der Oxidation von nicht-phenolischen Ligninen. Li postuliert ebenfalls die Bildung eines Benzotriazol-*N*-oxyl-Radikals, welches unter Regeneration zu HOBt die alkoholische Hydroxylgruppe des Lignins **45** in Benzylstellung selektiv zum Keton **46** oxidieren kann (Schema 3-12).



Schema 3-12: Selektive Oxidation des Lignins **45** in Benzylstellung⁸⁴

Für die Umlagerungsreaktion von Paullonen **3** zu Chinolincarbonensäuren **22** ist nach Pies die Anwesenheit von Luftsauerstoff und *N*-Hydroxybenzotriazol essentiell. In der Literatur wird berichtet, dass die reaktive Form des HOBt, das Benzotriazol-*N*-oxyl-Radikal (**44**), die radikalische Oxidation der oben vorgestellten Verbindungen katalysiert. Auch für die von uns beschriebene oxidative Umlagerung wird ein radikalisch initiiertes Mechanismus angenommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit und von Kohfeld konnte unter den genannten Bedingungen die Umlagerung von Paullonen **3** reproduziert werden. Allerdings konnte das Produkt **22** nur in sehr geringen Ausbeuten und erst nach einer Reaktionszeit von ca. 50 Tagen bei Raumtemperatur und Kontakt zu Luftsauerstoff gewonnen werden. Ein Hauptziel dieser Arbeit bestand daher in der Etablierung eines Syntheseverfahrens, das die gewünschten Zielverbindungen **22** in akzeptabler Zeit und zufriedenstellender Ausbeute darstellt. Außerdem sollten Untersuchungen zu Zwischenprodukten dieser neuartigen Ringverengungsreaktion Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus zulassen.

In einer ersten Versuchsreihe wurden verschiedene literaturbekannte Radikalinitiatormoleküle und Oxidationsmittel auf ihr Potential für die Umlagerung von Paullonen zu Chinolincarbonensäuren untersucht (Tabelle 3-3). Als Beispielsubstanz für die Umlagerung wurde 9-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3b**) gewählt (Schema 3-13).



Schema 3-13: Ringverengung bei Paullonen, verschiedene Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3-3

Tabelle 3-3: Einfluss verschiedener Radikalinitiatoren/Oxidationsmittel auf die Reaktionszeit der Umlagerung gemäß Schema 3-13

Radikalinitiator/ Oxidationsmittel	Eingesetzte Menge	Cokatalysator	Temperatur	Reaktionszeit ^a
Dibenzoylperoxid	10 mol%	-	RT	3 Monate
<i>N</i> -Hydroxyphthalimid ⁸⁵	10 mol%	-	RT	2 Monate
AIBN (Azobisisobutyronitril) ⁸⁶	10 mol%	-	RT	3 Monate
<i>N</i> -Hydroxyphthalimid ⁸⁵	20 mol%	-	RT	2 Monate
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	20 mol%	-	RT	2 Monate
DDQ ⁸⁷	300 mol%	-	RT	3 Tage, Dimer
DDQ ⁸⁷	äquimolar	-	RT	6 Tage, Dimer und Paullon
AIBN ⁸⁶	20 mol%	-	80 °C	1 Monat
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	äquimolar	Co(OAc) ₂	RT	7 Tage
<i>N</i> -Hydroxyphthalimid ⁸⁸	20 mol%	<i>n</i> -Bu ₄ NBr	RT	2 Monate
<i>N</i> -Hydroxyphthalimid	äquimolar	Co(OAc) ₂	RT	7 Tage
TEMPO (2,2,6,6-Tetra- methylpiperidin-1-oxyl)	äquimolar	-	60 °C	Abbruch n. 5 Monaten, kein Produkt
TEMPO ⁸⁹	äquimolar	Co(NO ₃) ₃	60 °C	Abbruch n. 5 Monaten, kein Produkt

^a Nach der angegebenen Zeit konnte das gewünschte Produkt isoliert werden. Alle Reaktionsansätze wurden in dem Lösungsmittel *N,N*-Dimethylformamid (DMF) durchgeführt. Das Paullon löste sich in DMF gut, das entstandene Produkt, die Chinolincarbonsäure, dagegen schlecht. Trat eine Trübung

der Lösung ein, war das ein Zeichen für die Produktbildung. Die Ansätze, in denen mit erhöhter Temperatur gearbeitet wurde, wurden ca. 6-8 Stunden auf die angegebene Temperatur erwärmt und anschließend über den angegebenen Zeitraum weiter bei Raumtemperatur gerührt. Die Radikalinitiation sollte durch die erhöhte Temperatur unterstützt werden. Eine Erwärmung des Reaktionsansatzes auf 65-70 °C stellte sich als optimal heraus und wurde im weiteren Verlauf der Syntheseoptimierung beibehalten.

In diesen ersten Übersichtversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Kombination der *N*-Hydroxyverbindungen *N*-Hydroxyphthalimid (NHPI) bzw. *N*-Hydroxysuccinimid (NHSI) mit Cobalt(II)acetat eine deutliche Beschleunigung der Umlagerung gegenüber den anderen eingesetzten Radikalinitiatoren bzw. Oxidationsmitteln bewirkte. Da Ishii⁹⁰ mit NHPI höhere Produktausbeuten als mit NHSI erzielte, wurde in weiteren Versuchen dieser Arbeit NHPI verwendet. Auf die katalytischen Eigenschaften dieser imidischen Hydroxylaminderivate für Oxidationsreaktionen wird in Kapitel 3.4.2 und 3.4.3 näher eingegangen.

Das starke Oxidationsmittel DDQ (2,3-Dichlor-5,6-dicyano-*p*-benzochinon), ein Benzochinonderivat, führte nicht zur gewünschten Darstellung der Chinolincarbonsäure **22b**, sondern zu einer von uns postulierten dimerisierten Struktur, die im Kapitel 3.7 näher erläutert wird.

Dibenzoylperoxid (DBPO) und Azobisisobutyronitril (AIBN) werden durch homolytische Spaltung unter Lichteinfluss in Radikale überführt und wirken dann als Initiatoren von Radikalreaktionen. In diesem speziellen Fall zeigten sie keine signifikant verbesserten Ergebnisse gegenüber der ursprünglich eingesetzten Verbindung *N*-Hydroxybenzotriazol.

TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl) wurde äquimolar gegenüber dem Paullon eingesetzt. Nach 5 Monaten war kein Niederschlag zu erkennen, und auf dem Dünnschichtchromatogramm konnte neben dem Paullon nur ein Nebenprodukt sehr geringer Intensität detektiert werden. Die Reaktion wurde daraufhin abgebrochen, da bei diesen Reaktionsbedingungen keine Umlagerung stattfand. TEMPO, ein beständiges Nitroxyl-Radikal, kann Wasserstoff nur aus sehr schwachen Bindungen abstrahieren. Die azepinische CH₂-Gruppe der Paullone **3** wird von TEMPO anscheinend nicht angegriffen. In einer Radikalkettenreaktion kann außerdem die

Fortsetzung der Kette unterbrochen werden, wenn das beständige Radikal TEMPO direkt wieder mit dem entstandenen Alkylradikal reagiert. TEMPO fungiert in einem solchen Fall als Radikalfänger.^{85, 91} Auch die Kombination von TEMPO mit dem Cokatalysator Cobaltnitrat zeigte keinen Erfolg (Tabelle 3-3).

3.4.2 Oxidationen mit *N*-Hydroxyphthalimid

In der Literatur beschreiben viele Arbeitsgruppen die Verwendung von *N*-Hydroxyphthalimid bei umweltschonenden Oxidationen von organischen Verbindungen.

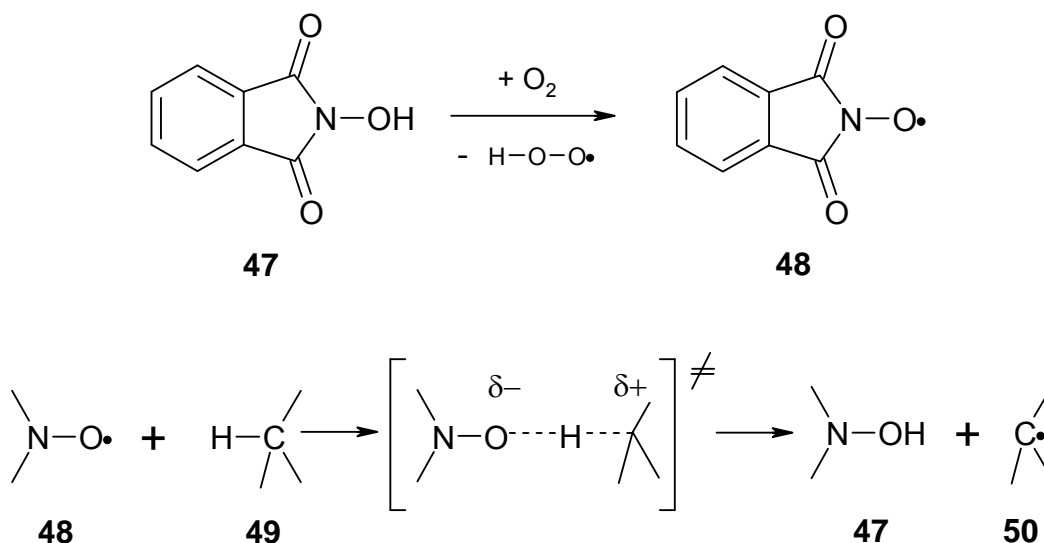
Recupero und Punta⁹¹ berichten in ihrem Übersichtsartikel von 2007 ausführlich über Oxidationen unterschiedlichster organischer Strukturen unter Zusatz von NHPI, diversen Cokatalysatoren und Sauerstoff als primärem Oxidans.

Die Insertion von Sauerstoff in CH-Bindungen stellt für organische Chemiker eine wichtige Aufgabe dar, da gesättigte Kohlenwasserstoffe in Form von Erdöl und Erdgas in großer Menge vorhanden sind und als Edukte für organische Synthesen zur Verfügung stehen. Sauerstoff, ein paramagnetisches Diradikal, ist trotz seines radikalischen Charakters ein relativ unreaktives Molekül gegenüber starken CH-Bindungen. Übergangsmetalle spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Sauerstoff.

N-Hydroxyphthalimid stellt einen neuen Organokatalysator dar, der in den letzten Jahren sehr an Bedeutung gewonnen hat. NHPI ist ein günstiger und ungiftiger Katalysator, der in seiner aktiven Form, dem korrespondierenden Phthalimid-*N*-oxyl-Radikal (PINO), in der Lage ist, Wasserstoff aus CH-Bindungen zu abstrahieren. Für die ringverengende Umlagerung der Paullone **3** zu 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** muss die azepinische CH₂-Gruppe des Benzazepinon-Rings unter Abspaltung eines Wasserstoffradikals angegriffen werden. PINO scheint sich in Kombination mit Cobalt(II)acetat für diesen Angriff zu eignen (Tabelle 3-3). Der postulierte Reaktionsmechanismus der Umlagerungsreaktion wird in Kapitel 3.5 vorgestellt.

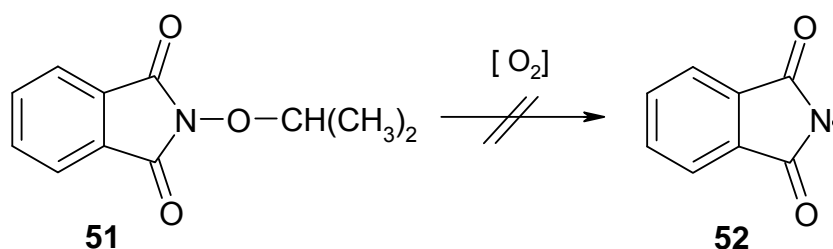
Allgemeiner Reaktionsmechanismus von *N*-Hydroxyphthalimid

Sauerstoff und NHPI (**47**) bilden in einer freien Autoxidation das Phthalimid-*N*-oxyl-Radikal (PINO) (**48**), das im initialen Schritt der Oxidation die zu oxidierende Verbindung **49** radikalisch angreift (Schema 3-14). Der dargestellte Übergangszustand wird bei PINO aufgrund von ausgeprägten polaren Effekten stärker stabilisiert als bei z. B. Peroxylradikalen.⁹¹



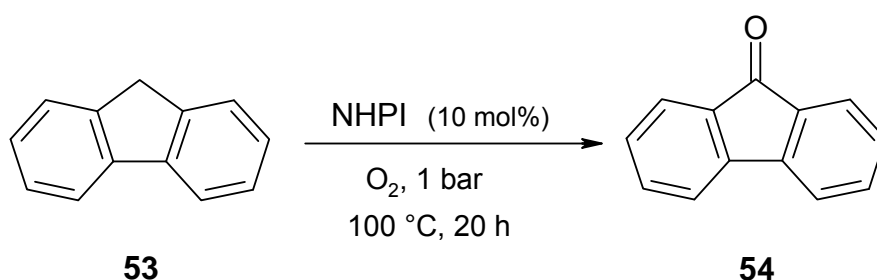
Schema 3-14: Wasserstoffabstraktion aus CH-Bindungen durch das Phthalimid-*N*-oxyl-Radikal (PINO) (**48**)

Um die Existenz des PINO-Radikals zu verifizieren, wurde statt NHPI ein *N*-Isopropoxyphthalimid (**51**) als potentiell Oxidationsmittel verwendet. Es fand keine Oxidation statt, so dass die Bildung eines Phthalimid-Radikals (**52**) durch den Bruch einer Stickstoff-Sauerstoff-Bindung ausgeschlossen wurde (Schema 3-15).⁸⁵



Schema 3-15: Beweis der Existenz des Phthalimid-*N*-oxyl-Radikals (PINO) (**48**)⁸⁵

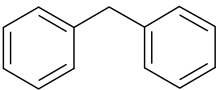
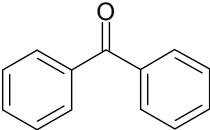
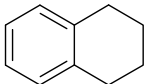
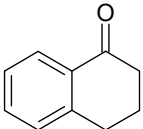
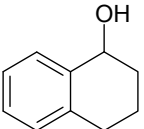
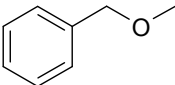
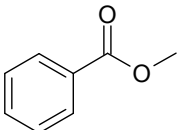

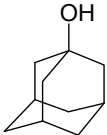
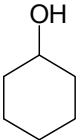
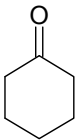
Ishii und Mitarbeiter⁸⁵ veröffentlichten 1995 die selektive Oxidation von Fluoren (**53**) unter Verwendung katalytischer Mengen NHPI und Sauerstoff-Atmosphäre (1 bar). Nach 20-stündigem Erhitzen bei 100 °C in Benzonitril konnte das Fluorenon (**54**) in 80%iger Ausbeute isoliert werden (Schema 3-16). Wurde statt NHPI *N*-Hydroxy-succinimid als Katalysator verwendet, wurde **54** in 50%iger Ausbeute gewonnen.⁹⁰ Im Gegensatz zu den in Kapitel 3.4 beschriebenen Reaktionen liegen hier keine enzymatischen oder elektrochemischen Reaktionsbedingungen vor.



Schema 3-16: Oxidation von Fluoren (**53**) mit NHPI⁸⁵

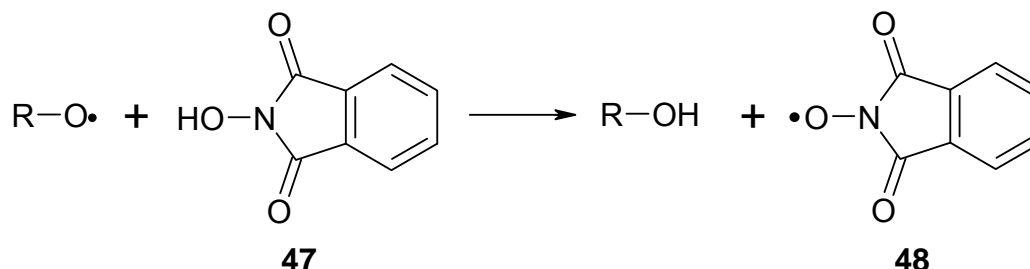
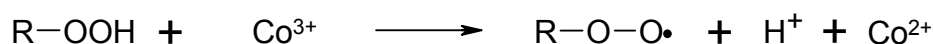
Die Arbeitsgruppe konnte unter den beschriebenen Bedingungen noch diverse andere Substrate selektiv oxidieren und so die Allgemeingültigkeit ihrer entwickelten Methode beweisen. Einige Beispiele sind in Tabelle 3-4 aufgezeigt.

Tabelle 3-4: Ausgewählte Beispiele für die Oxidation mit dem System NHPI/O₂ unter den in Schema 3-16 dargestellten Bedingungen nach Ishii⁸⁵

Substrat	Produkt/Produkte	Ausbeute in %
		73
	 + 	37 + 13
		60
		12
		56

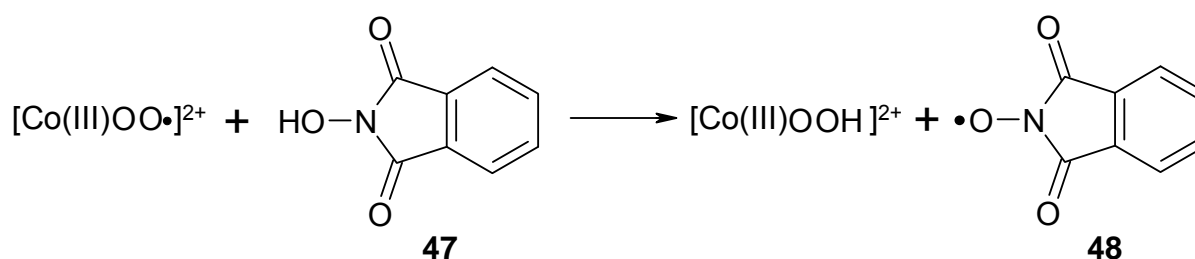
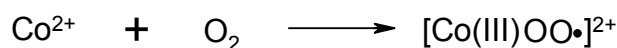
3.4.3 Kombination von *N*-Hydroxyphthalimid mit Metallsalzen als Cokatalysatoren

In zahlreichen Veröffentlichungen wird über die Verwendung von Metallsalzen als Cokatalysatoren berichtet.⁹²⁻⁹⁵ Der Zusatz von Übergangsmetallsalzen wie Kupfer-, Mangan-, Cobalt- oder Eisensalzen beschleunigt Autoxidationsreaktionen, indem die Salze intermediär entstehende Hydroperoxide zu Alkoxyradikalen abbauen. Diese Alkoxyradikale werden von NHPI (**47**) unter Bildung von PINO (**48**) abgefangen. Die neu entstandenen PINO-Radikale unterhalten die Radikalreaktion (Schema 3-17).⁹¹



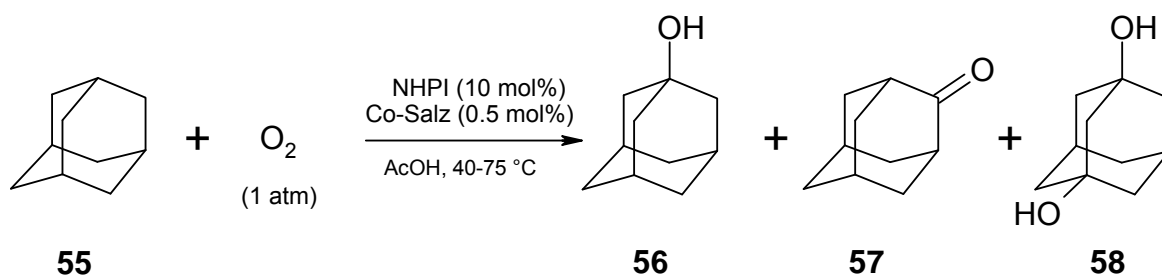
Schema 3-17: Zersetzung von Hydroperoxiden zu Alkoxy- und Peroxyradikalen durch Cobaltionen

Außerdem können Cobaltionen effektiv Sauerstoff binden und im Initiationsschritt in Form von $[\text{Co(III)OO}\cdot]^{2+}$ aus NHPI Wasserstoff abstrahieren und auf diesem Weg PINO (**48**) erzeugen (Schema 3-18).⁹¹



Schema 3-18: Darstellung von PINO (**48**)

Der Einsatz von Salzen wie Cobalt(II)acetat oder Cobalt(II)- bzw. Cobalt(III)acetylacetonat in Kombination mit NHPI bewirkt zum Beispiel bei der Oxidation von Adamantan eine deutliche Beschleunigung der Reaktion und eine Erhöhung der Ausbeute der hydroxylierten Produkte (Schema 3-19 und Tabelle 3-5).⁹⁰



Schema 3-19: Oxidation von Adamantan (**55**) mit dem System NHPI/Cobalt-salz/ O_2 ⁹³

Tabelle 3-5: Oxidation von Adamantan (**55**) unter Katalyse von NHPI ohne und mit Zusatz verschiedener Cobaltsalze nach Ishii⁹³

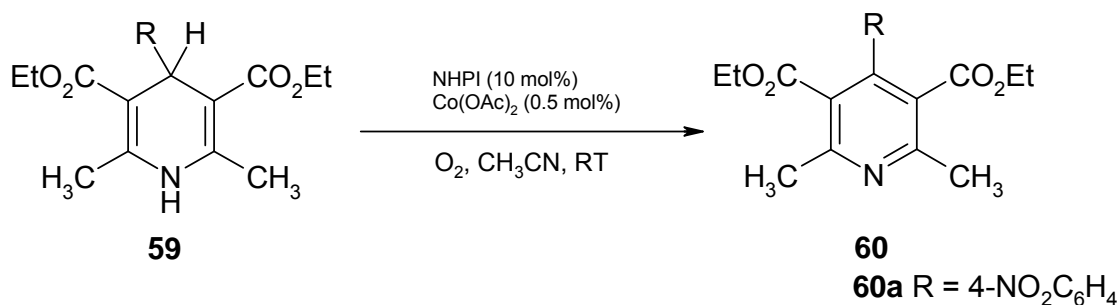
Metallsalz	Umsetzung in %	Ausbeute in % (bezogen auf die umgesetzte Menge)		
		56	57	58
-	17	52	-	-
$\text{Co}(\text{acac})_2$	93	43	8	40
$\text{Co}(\text{OAc})_2$	>99	21	6	54

Die Umsetzung des Eduktes lag bei Verwendung eines Metallsalz-Cokatalysators bei über 90% gegenüber nur 17% bei ausschließlicher Katalyse durch *N*-Hydroxyphthalimid.⁹³

Die Arbeitsgruppe um Han verwendete das System *N*-Hydroxyphthalimid/Cobalt(II)-acetat unter Sauerstoff-Atmosphäre, um verschieden substituierte Dihydropyridine **59** zu den korrespondierenden Aromaten zu oxidieren.

Han und Mitarbeiter führten dieselben Oxidationen auch ohne den Zusatz von Cobalt(II)acetat durch und konnten beobachten, dass die Produkte **60** dann bei Raumtemperatur wesentlich schwerer zugänglich waren. Um bei diesen Reaktionen

gleichwertige Ergebnisse erzielen zu können, mussten sie unter Erhitzen zum Rückfluss durchgeführt werden. Das Derivat **60a** konnte nur unter den optimierten Bedingungen erhalten werden (Schema 3-20).⁹⁶



Schema 3-20: Oxidation von Dihydropyridinen **59** mit NHPI/Co(OAc)₂/O₂⁹⁶

3.4.4 Weitere Methodenentwicklung für die gezielte Synthese von 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren

Das katalytische System NHPI/Cobalt(II)acetat sollte für die Darstellung der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** aus Paullonen **3** weiterentwickelt werden. Einflüsse von zunehmenden Mengen NHPI, verschiedene Cobaltsalze als Co-katalysatoren und die Verwendung von reinem Sauerstoff statt Luft als Oxidationsmittel sollten im Hinblick auf die Verkürzung der Reaktionszeit und die Optimierung der Ausbeute untersucht werden.

Einfluss der zugegebenen Menge an *N*-Hydroxyphthalimid

In einer Ansatzreihe mit variierenden Mengen an *N*-Hydroxyphthalimid sollte geklärt werden, ob eine Erhöhung der Menge an Radikalinitiator zu einer verkürzten Reaktionszeit und zu höheren Ausbeuten führen könnte. Die Menge an Cokatalysator Cobalt(II)acetat wurde bei allen Ansätzen konstant gehalten.

Tabelle 3-6: Einfluss der eingesetzten Menge NHPI auf die Ausbeute

Menge NHPI	Zeit bis zur Niederschlagsbildung	Ausbeute in % ^a	HPLC-Reinheit in % ^b
20% molar	3 Tage	12,2	98.3/99.3
50% molar	3,5 Stunden	20,0	98.7/99.5
Äquimolar	2 Stunden	17,2	98.0/99.2
200% molar	1,5 Stunden	27,5	99.1/99.5

Alle Ansätze wurden 8 Stunden bei 65-70°C gerührt. Anschließend wurde für 7 Tage weiter bei Raumtemperatur gerührt.

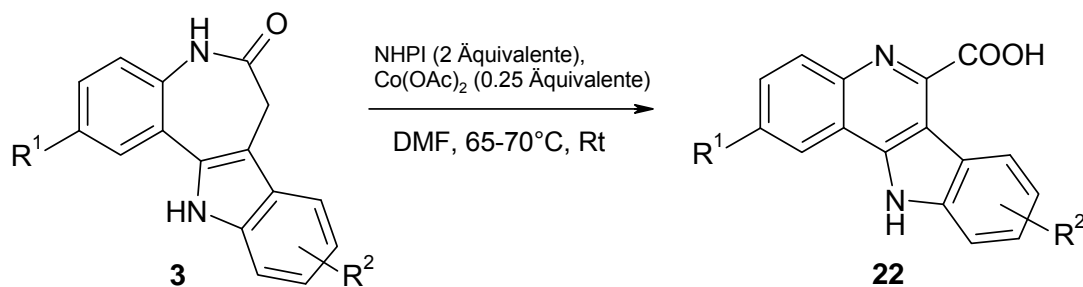
^a Die entstandenen Niederschläge wurden abfiltriert, vorsichtig mit DMF (ca. 1 ml) und anschließend gründlich mit viel Wasser (100 ml) gewaschen. Dann wurden die entstandenen Chinolincarbon-säuren **22** getrocknet, die Ausbeuten bestimmt und die Stoffe auf ihre Reinheit an der HPLC überprüft.

^b Bestimmung des Gehaltes an Chinolincarbonsäure **22** nach der 100%-Methode mit einem UV-Detektor bei den Wellenlängen 254 nm und 280 nm.

Die Versuche zeigten, dass eine Erhöhung der Menge von *N*-Hydroxyphthalimid sowohl eine Verkürzung der Reaktionszeit als auch eine Erhöhung der Ausbeute zur Folge hatte. Eine Ausnahme, die jedoch nicht signifikant war, stellte die Ausbeute des äquimolaren Ansatzes dar. Eine Erhöhung der Radikalstartermenge führte nicht zu Verlusten der Reinheit des gewünschten Produktes.

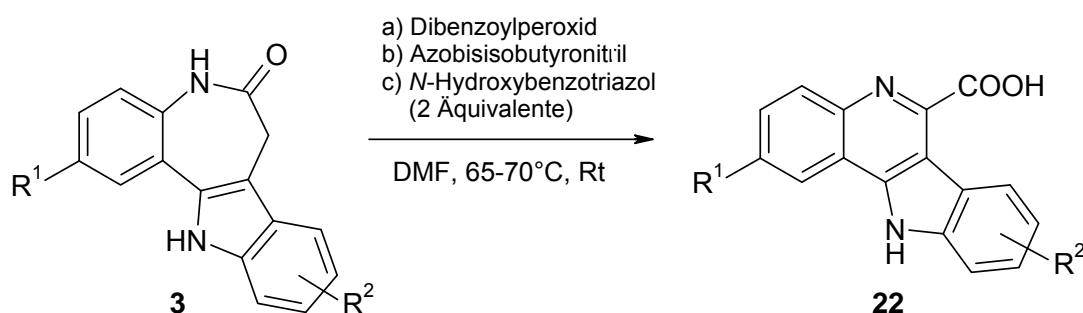
Obwohl in der Literatur nur katalytische Mengen NHPI verwendet werden, wurden in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit einem zweifachen Überschuss NHPI die besten Ergebnisse erzielt (Tabelle 3-6).

Da es sich bei NHPI um ein kostengünstiges und wenig toxisches Reagenz handelt, wurde für die Synthese der Zielstrukturen **22** das Verhältnis 1 Äquivalent Paullon zu 2 Äquivalenten NHPI beibehalten. Die Verbindungen **22a-I**, **p** und **s** (Tabelle 3-9) konnten auf diesem Weg (Methode A) dargestellt werden (Schema 3-21).



Schema 3-21: Synthese von 11H-Indolo[3,2-c]chinolin-6-carbonsäuren **22** aus Paullonen **3** mit dem System NHPI/Co(OAc)₂/Luft (Methode A)

Die Radikalinitiatoren aus der ersten Versuchsreihe (Tabelle 3-3) wurden erneut parallel untersucht, um auszuschließen, dass sie unter den beschriebenen optimierten Bedingungen (doppelt äquimolare Menge an Radikalinitiator und an der Luft bei 65-70 °C) ähnlich gute Ergebnisse wie das System *N*-Hydroxyphthalimid/Cobalt(II)acetat zeigen könnten (Schema 3-22). Als Kriterien wurden die Zeit bis zum Auftreten eines Niederschlags und eine HPLC-Kontrolle des Reaktionsansatzes nach 3 Wochen herangezogen (Tabelle 3-7). Als Positivkontrolle wurde parallel ein Ansatz mit *N*-Hydroxyphthalimid/Cobalt(II)acetat beobachtet. Nach 2 Stunden war hier ein deutlicher Niederschlag zu erkennen.



Schema 3-22: Synthese von 11H-Indolo[3,2-c]chinolin-6-carbonsäuren **22** aus Paullonen **3** mit verschiedenen Radikalinitiatoren

Tabelle 3-7: Austausch von NHPI gegen andere Radikalinitiatoren (Dibenzoylperoxid, Azobisisobutyronitril und *N*-Hydroxybenzotriazol) unter den optimierten Bedingungen des NHPI/Cobalt(II)acetat-Systems

Radikal-initiator (200% molar)	Zeit bis zur Niederschlagsbildung	HPLC-Flächenanteile100%-Methode - 254 nm	HPLC-Flächenanteile100%-Methode - 280 nm
a) DBPO	Nach 3 Wochen keine Trübung	Chinolincarbonsäure (17 %) Paullon (11 %)	Chinolincarbonsäure (57 %) Paullon (4 %)
b) AIBN	2 Tage	Chinolincarbonsäure (14 %) Paullon (54 %)	Chinolincarbonsäure (49 %) Paullon (29 %)
c) HOBt	1,5 Tage	Chinolincarbonsäure (86 %) Paullon (3 %)	Chinolincarbonsäure (97 %) Paullon (0,5 %)

Nach den in Tabelle 3-7 dargestellten Ergebnissen waren alle drei untersuchten alternativen Radikalinitiatoren auch unter den optimierten Bedingungen dem System *N*-Hydroxyphthalimid/Cobalt(II)acetat deutlich unterlegen. Sie wurden nicht weiter eingesetzt. Diese Ergebnisse sind damit zu erklären, dass das Phthalimid-*N*-oxyl-Radikal (PINO) (**48**) reaktiver als das Benzotriazol-*N*-oxyl-Radikal (BTNO) (**44**) ist und leichter Wasserstoff aus CH-Bindungen abstrahieren kann. Die Energie der N-OH-Bindung (BDE = *bond dissociation energy*) in NHPI liegt mit 88 kcal/mol höher als die in HOBt mit 85 kcal/mol. Diese Bindungsenergie ist ein Maß für die Reaktivität der korrespondierenden Radikale PINO und BTNO, da nach erfolgter Wasserstoff-Abstraktion von einem CH-Substrat NHPI und HOBt regeneriert werden.^{95, 97}

Eingesetzte Cobaltkatalysatoren

In den zitierten Veröffentlichungen verwendeten die Arbeitsgruppen neben Cobalt(II)acetat auch andere cobalthaltige Cokatalysatoren. Karimi und Mitarbeiter hatten mit der Verwendung von NHPI und dem lipophileren Cobalt(II)benzoat Erfolg bei der Oxidation von Benzyltrimethylsilylthern zu den entsprechenden Carbonylkomponenten.⁹⁸ Die Arbeitsgruppe um Ishii verwendete auch Cobalt(III)acetylacetonat. Co(salen) (**61**), ein Komplex aus einem Co^{2+} -Ion und einem Bis(salicyliden)ethylendiamin-Liganden, kann reversibel Sauerstoff binden und wird als Katalysator in Oxidationen unter Sauerstoff-Atmosphäre verwendet (Abbildung 3-5).^{99, 100} Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Co(salen) in Kombination mit NHPI verwendet. In drei Parallelansätzen wurden Co(salen) und Cobalt(III)acetylacetonat mit Cobalt(II)acetat verglichen, wobei jeweils im Verhältnis zu dem als Edukt verwendeten Paullon 2 Äquivalente NHPI und 0.25 Äquivalente Cokatalysator eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden parallel 8 Stunden auf 65-70 °C erhitzt, im Anschluss offen bei Raumtemperatur gerührt und ihre Niederschlagsbildung beobachtet (analog zu Schema 3-21). Nach einwöchigem Rühren bei Raumtemperatur war bei dem Ansatz mit Co(salen) kein Niederschlag durch ausgefallenes Produkt zu erkennen. Der Ansatz mit NHPI/Cobalt(III)acetylacetonat zeigte nach einem Tag einen Niederschlag. Da bei der Verwendung von Cobalt(II)acetat schnellere Umsetzungen erzielt worden waren, wurden die in dieser Versuchsreihe untersuchten alternativen Katalysatoren nicht weiter berücksichtigt.

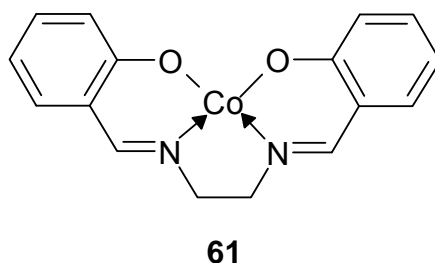


Abbildung 3-5: Struktur des Cobaltkomplexes Co(salen) (**61**)

Verwendung von reinem Sauerstoff als Oxidationsmittel

Pies stellte in ihren Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Ringkontraktion von Paullonen **3** zu 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** fest, dass die Anwesenheit von Luftsauerstoff essentiell für die Umlagerung ist.⁶⁵ In der bisher optimierten Methode war der Kolben während der gesamten Reaktionszeit geöffnet, so dass der Ansatz Kontakt zu Luftsauerstoff hatte. Reiner Sauerstoff besitzt ein wesentlich höheres Oxidationsvermögen als Luft. In einem weiteren Optimierungsschritt der Reaktion wurde daher eine Gaseinleitungsapparatur für Sauerstoff verwendet. Die Ansätze wurden zur Initiation der Oxidation 8 Stunden unter Sauerstoff-Atmosphäre und anschließend weiter bei offenem Kolben und Kontakt zur Luft gerührt. In Parallelansätzen mit vier verschiedenen Paullonen **3a**, **b**, **e** und **i** wurde die bisher verwendete Methode A an der Luft mit der Methode unter Sauerstoff-Atmosphäre (Methode B) verglichen (Tabelle 3-8).

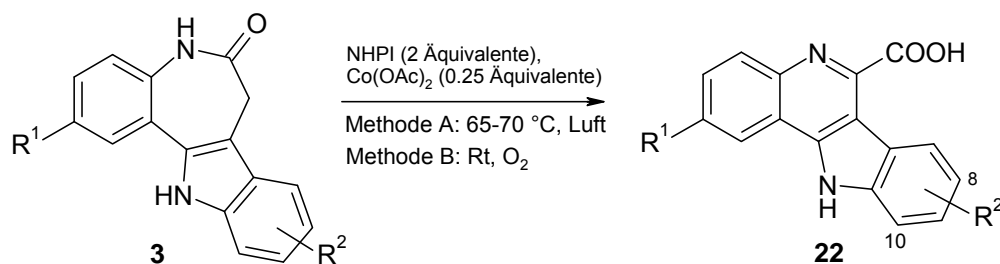
Tabelle 3-8: Parallelansätze zum Vergleich der Methoden A und B ^a

R²	Ausbeute unter Luftkontakt (Methode A) in [%]	HPLC- Reinheit in [%] ^b	Ausbeute unter O ₂ -Atmosphäre (Methode B) in [%]	HPLC- Reinheit in [%] ^b
8-Cl	32	99.9/100.0	60	99.9/100.0
8-Br	18	99.6/99.9	33	98.9/99.5
8-CF ₃	47	99.9/100.0	59	97.6/100.0
8-COOH	32	99.3/99.4	46	99.2/99.2

^a Die jeweils parallel laufenden Ansätze wurden exakt gleich behandelt (Einwaage der Edukte, Reaktionsstartzeit, Reaktionsdauer 8 h unter Temperatureinwirkung und Luftkontakt/8 h unter O₂-Atmosphäre, Reinigung des Produktes). Anschließend wurden die Ausbeuten der entstandenen Chinolincarbonsäuren **22** bestimmt.

^b Bestimmung des Gehaltes an Chinolincarbonsäure **22** nach der 100%-Methode mit einem UV-Detektor bei den Wellenlängen 254 nm und 280 nm.

Die Tabelle 3-8 zeigt, dass die Ausbeuten erheblich gesteigert werden konnten. Die Anwesenheit von Sauerstoff bewirkte bei den Verbindungen eine Erhöhung der Ausbeute um bis zu 100 %.



Schema 3-23: Synthese von 11H-Indolo[3,2-c]chinolin-6-carbonsäuren **22** aus Paullonen **3** nach den Methoden A und B¹⁰¹

Tabelle 3-9: Nach den Methoden A und B dargestellte Verbindungen **22**

22	R ¹	R ²	Ausbeute nach Methode A in [%] ^a	Ausbeute nach Methode B in [%] ^a
a	H	8-Br	18	33
b	H	8-Cl	32	60
c	H	8-H	39	-
d	H	8-C(CH ₃) ₃	34	27
e	H	8-CF ₃	49	59
f	H	8-CH ₃	13	-
h	H	8-NO ₂	53	-
i	H	8-COOH	32	46
j	H	10-Br	22	-
k	H	10-Cl	46	-
l	OCH ₃	8-C(CH ₃) ₃	19	-
n	OCH ₃	8-CF ₃	-	34
o	OCH ₃	8-COOH	-	57
p	I	8-Cl	62	-
q	I	8-F	-	68
r	I	8-H	-	40
s	I	8-C(CH ₃) ₃	20	43

^a – bedeutet, dass die jeweilige Verbindung nach dieser Methode nicht dargestellt wurde.

3.4.5 Isolierung der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren aus den Reaktionsgemischen

Die Reinigung der dargestellten Verbindungen **22** erwies sich als schwierig. Während der Synthese wurden in regelmäßigen Abständen Proben gezogen und dünn-schichtchromatographisch untersucht. Die Chromatogramme zeigten das Vorhandensein einer Vielzahl von Nebenprodukten neben dem gewünschten Produkt. Auch HPLC-Inprozesskontrollen bestätigten neben der Entstehung der jeweiligen Chinolincarbonsäure **22** das Vorhandensein mehrerer unbekannter Nebenprodukte. Das eingesetzte Edukt, das jeweilige Paullon, ließ sich im Lösungsmittel DMF gut lösen. Die Substanzklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** ist grundsätzlich in den üblichen organischen Lösungsmitteln (Ethanol, Ethylacetat, Dichlormethan, Aceton, DMF) schwerlöslich und fiel aus dem Reaktionsansatz aus. Über diese Schwerlöslichkeit konnten die Verbindungen **22** durch Filtration von den in Lösung befindlichen Reaktionsbestandteilen abgetrennt werden. Die Produkte **22** wurden mit wenigen ml DMF nachgewaschen, um eventuell anhaftende Reste des Paullons **3** zu entfernen. Das anschließende Waschen der Niederschläge mit Ethanol und viel Wasser (ca. 200 ml) diente dem Entfernen von anorganischen Rückständen der Katalysatorsalze.

Bei mehreren Verbindungen (**22c**, **22i**, **22l** und **22o**) wichen die Elementaranalysen trotz zufriedenstellender HPLC-Reinheiten stark ab. Durch Aufkochen der Verbindungen in Ethanol konnten die entsprechenden, durch HPLC nicht detektierbaren Verunreinigungen entfernt werden.

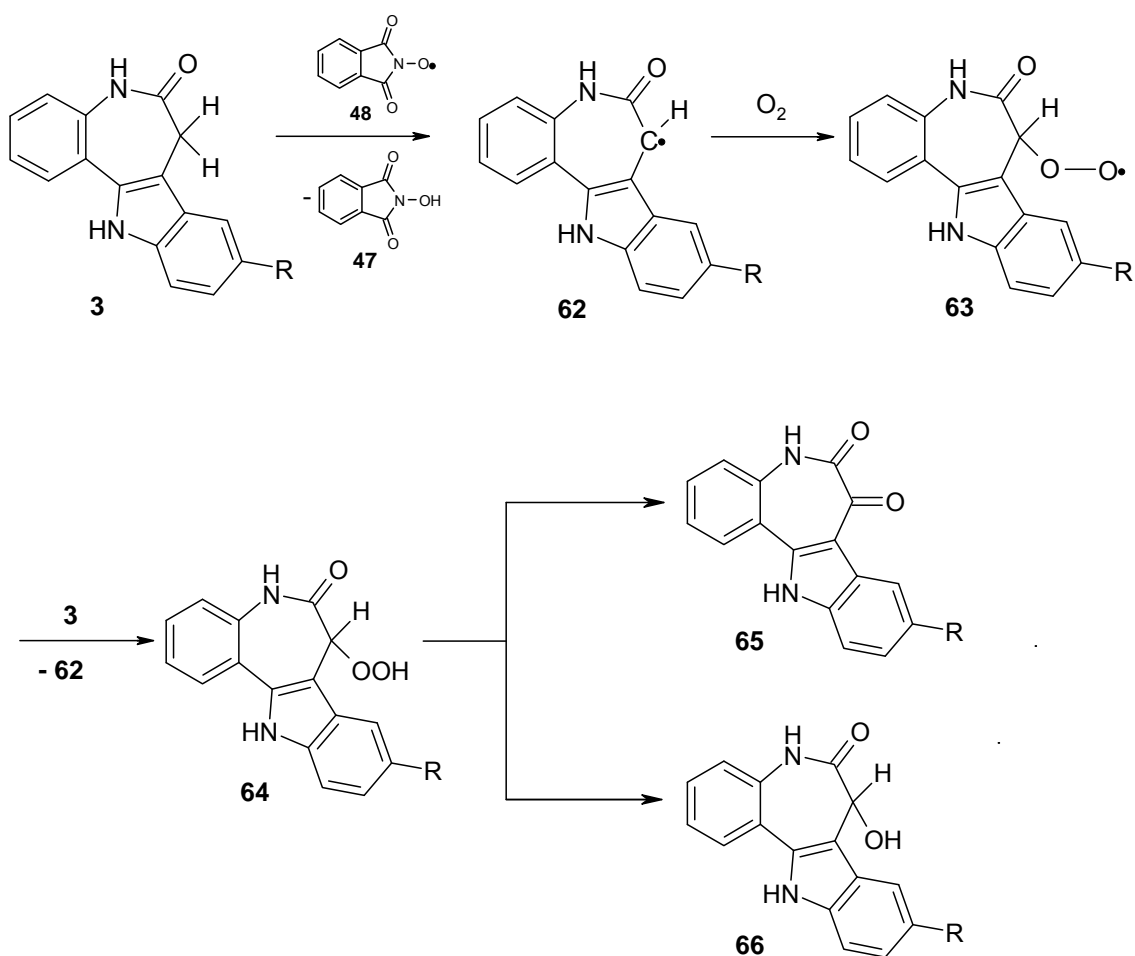
Im HPLC-Chromatogramm der 10-Chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22k**) wurde eine Verunreinigung von ca. 5% detektiert, die dem entsprechenden 9-Chlor-Isomer zugeordnet wurde. Dieses Isomer resultiert aus der Umlagerung des als Edukt verwendeten Paullons **3k**, welches ebenfalls durch ein Isomer leicht verunreinigt war. Bei der Zyklisierung ortho-substituierter Hydrazone zu Indolen entstehen häufig Nebenprodukte mit Änderungen des Substitutionsmusters, in diesem Fall ein Isomer des Paullons **3k**. Dieses Phänomen der sogenannten „Halogenwanderung“ wurde von Schultz ausführlich diskutiert.⁶⁷

3.5 Mechanismus der Ringverengung von Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinonen zu 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren

In Anlehnung an die experimentell erhobenen Daten aus Kapitel 3.4 und mechanistische Studien aus der Literatur wurde ein vorstellbarer Reaktionsmechanismus formuliert.

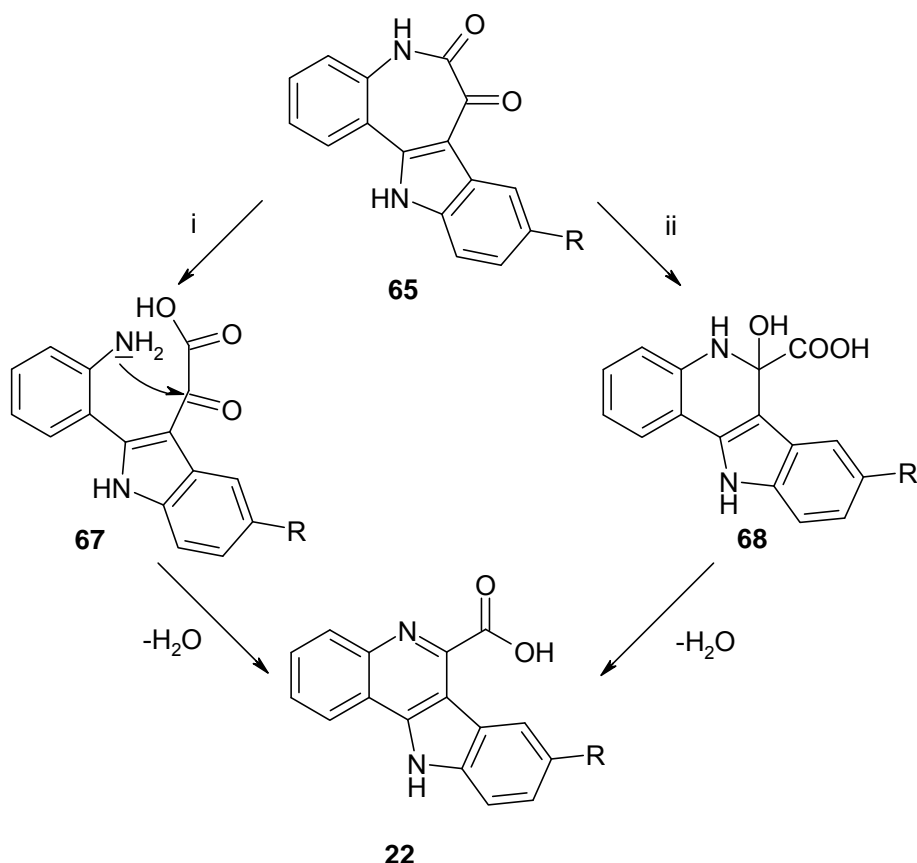
Demnach greift das Phthalimid-*N*-oxyl-Radikal (PINO) (**48**), dessen Bildung aus NHPI (**47**) und Sauerstoff unter Katalyse von Cobalt(II)acetat in den Kapiteln 3.4.2 und 3.4.3 erläutert wurde, die azepinische CH₂-Gruppe des Paullons **3** an. Nach Wasserstoffabstraktion bildet sich das Alkylradikal **62**, und NHPI (**47**) wird regeneriert. Die Vereinigung von **62** mit dem Diradikal Sauerstoff bildet das Peroxidradikal **63**, welches erneut mit einem Paullon-Molekül **3** zum Hydroperoxid **64** weiterreagiert. Dieses Hydroperoxid ist instabil und disproportioniert leicht zu der Benzazepindion-Struktur **65** und der alkoholischen Struktur **66** (Schema 3-24).

Wahrscheinlich sind komplexe Mechanismen an der Bildung von **65** und **66** aus dem Hydroperoxid **64** beteiligt. Die in Schema 3-17 beschriebene, durch Cobaltsalze katalysierte Zersetzung von Hydroperoxiden zu Alkoxy- und Peroxidradikalen könnte eine wichtige Rolle spielen. So könnte die Reaktion des Hydroperoxids **64** mit einem Co³⁺-Ion zur Entstehung eines Peroxidradikals **63** führen. Nach dem Russell-Mechanismus können zwei Alkylperoxidradikale ein Tetroxid, eine nicht-radikalische Zwischenstufe, bilden. Dieses Tetroxid zerfällt in einer elektrozyklischen Reaktion unter Sauerstoffabgabe zu einem Keton und einem Alkohol.^{102, 103} Zwei Moleküle **63** könnten in Analogie zu Russell ein solches Tetroxid bilden, welches anschließend unter Sauerstoffabgabe zu der Benzazepindion-Struktur **65** und der alkoholischen Struktur **66** zerfallen könnte.



Schema 3-24: Mechanismus der Umlagerung von Paullonen **3** (I)

Die finale Entstehung des aromatischen Chinolinrings **22** kann ausgehend von **65** (Schema 3-25) und **66** (Schema 3-27) auf unterschiedlichen Wegen formuliert werden. Für die Ringverengung von 5,12-Dihydroindolo[3,2-*d*]benzazepin-6,7-dion (**65**) sind Wege unter Ringöffnung (i) und unter 1,2-Umlagerung (ii) möglich:

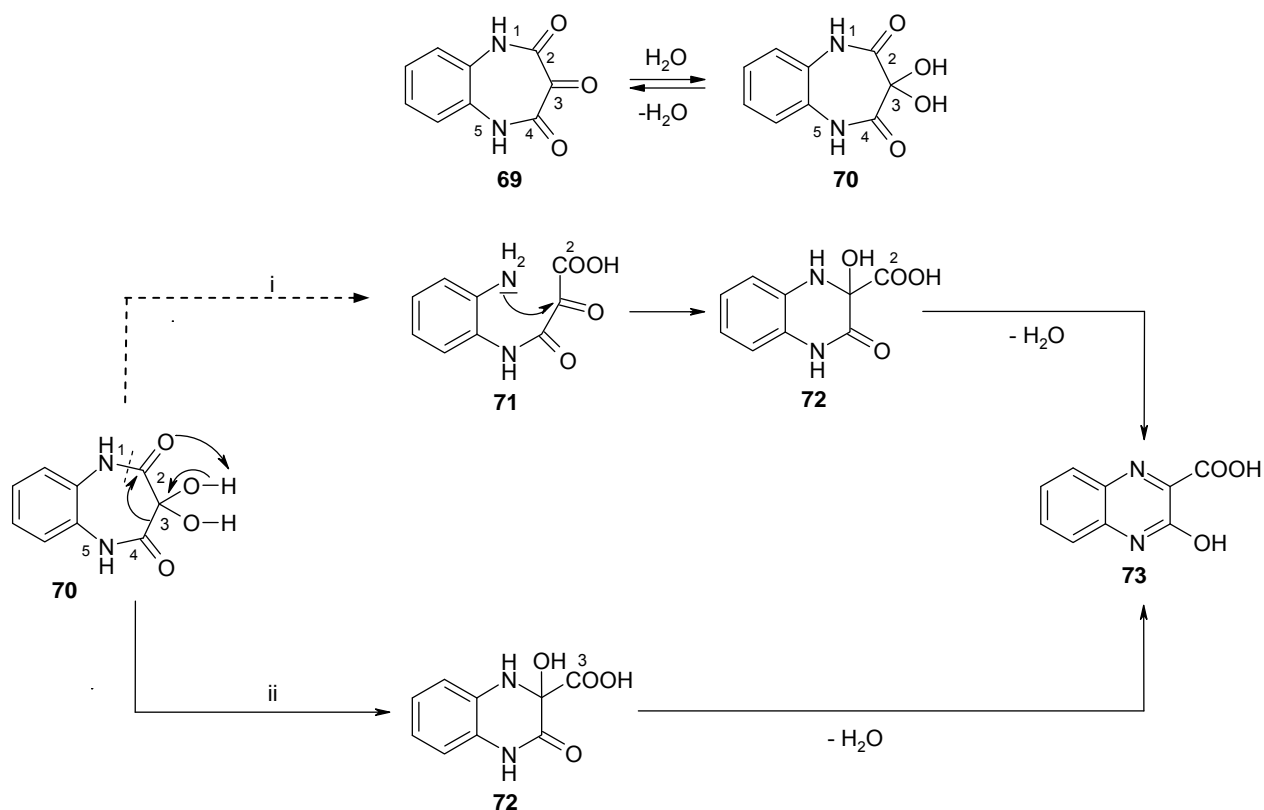


Schema 3-25: Mechanismus der Umlagerung von Paullonen **3** (II)

Durch hydrolytische Spaltung der Lactam-Bindung und daraus resultierender Ringöffnung entsteht die α -Oxocarbonsäure **67**. Der nukleophile Angriff der freien Aminogruppe an der Carbonylgruppe führt unter Wasserabspaltung zum Ringschluss (Weg i). Alternativ kann die Bildung der Chinolincarbonsäure **22** auch analog zu einer Benzil-Benzilsäure-Umlagerung erklärt werden (Weg ii).

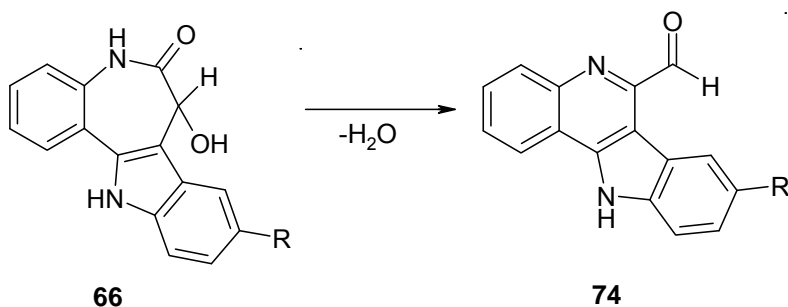
Dolenz und Kollenz führten Untersuchungen zum Mechanismus der Ringverengung von 1*H*-1,5-Benzodiazepin-2,3,4(5*H*)-trion (**69**) durch: Die Verbindung **69** steht im Gleichgewicht mit ihrem Hydrat **70**. Auch hier formulierte die Arbeitsgruppe die Möglichkeit einer Ringöffnung unter Lactam-Spaltung und anschließendem Ringschluss unter Bildung einer exozyklischen Carbonsäure (Weg i). Eine C2-C4-Verknüpfung mit der Verdrängung des C3-Kohlenstoffs aus dem Ring im Sinne einer Benzil-Benzilsäure-Umlagerung stellt der Weg ii dar (Schema 3-26). Mit Hilfe von an Position 2 und Position 3 ^{14}C -markierten Modellschubstanzen konnte gezeigt werden, dass hier eine thermische Ringverengung zu 90% nach dem zweiten beschriebenen

Reaktionsweg (ii) abläuft. Eine sauer katalysierte Ringverengung dagegen verläuft unter Öffnung einer der beiden chemisch äquivalenten Lactam-Bindungen (i).¹⁰⁴



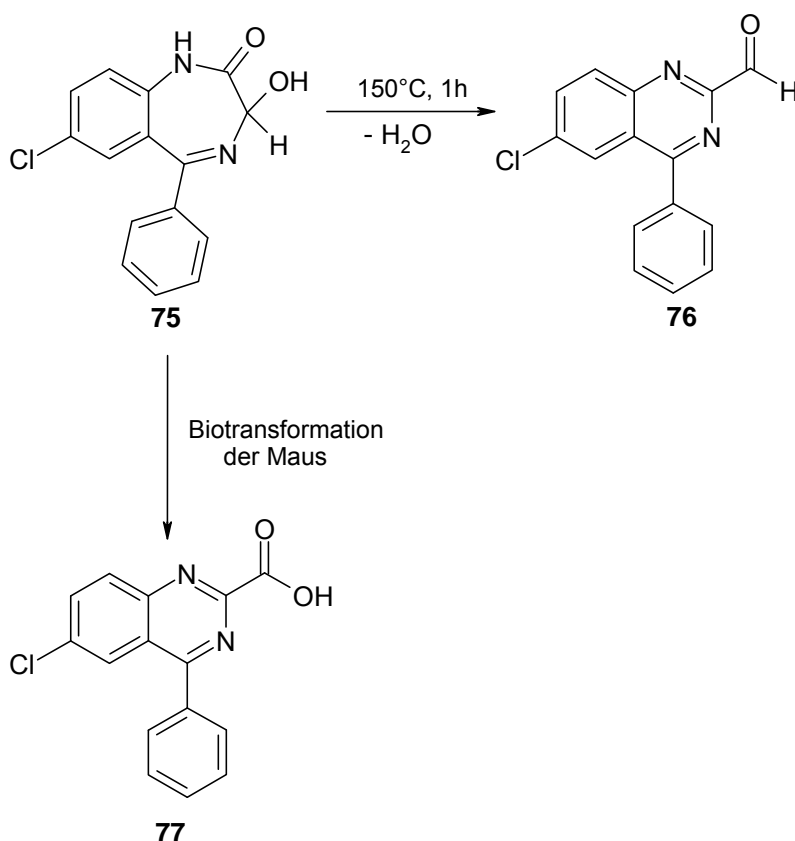
Schema 3-26: Ringverengung des 1H-1,5-Benzodiazepin-2,3,4(5H)-trions (**69**) nach Dollenz und Kollenz¹⁰⁴

Ausgehend von der α -Hydroxylactam-Struktur **66** könnte in Analogie zu der literaturbekannten Ringverengung von verschiedenen Benzodiazepinen auch eine Ringverengung zu einem Chinolin-2-carbaldehyd **74** unter Wasserabspaltung eintreten (Schema 3-27).¹⁰⁵ **74** könnte anschließend unter radikalischen Bedingungen weiter zur Carbonsäure **22** oxidiert werden.



Schema 3-27: Ringverengung zum Chinolin-2-carbaldehyd **74**, Mechanismus der Umlagerung von Paullonen **3** (III)

Das Psychopharmakon Oxazepam (**75**) spaltet bei 150 °C Wasser ab und wird dabei zu einem Chinazolin-2-carbaldehyd **76** ringverengt.¹⁰⁵ Sisenwine konnte bei Untersuchungen zum Metabolismus von Oxazepam in Mäusen auch die korrespondierende Chinazolin-2-carbonsäure **77** im aufgefangenen Urin der Mäuse nachweisen.¹⁰⁶ Unter endogenen oxidativen Bedingungen kann also auch eine Ringverengung des Benzodiazepinringes von **75** zu der Chinazolin-2-carbonsäure **77** stattfinden (Schema 3-28).



Schema 3-28: Ringverengung von Oxazepam^{105, 106}

Alternativ zu dem in Schema 3-27 dargestellten Mechanismus ist auch vorstellbar, dass unter Katalyse des verwendeten NHPI/Cobalt(II)acetat/ O_2 -Systems eine oxidative Umwandlung der α -Hydroxylactam-Struktur **66** in die Benzazepindion-Verbindung **65** erfolgt. Der Mechanismus der Oxidation eines Alkohols zu einem Keton mit dem NHPI/Cobalt(II)acetat/ O_2 -System wird in einem Übersichtsartikel von Recupero und Punta beschrieben.⁹¹ In Abbildung 3-6 (Weg i) ist dargestellt, wie PINO (**48**) die CH-Bindung des Alkohols, z. B. **66**, unter Bildung eines Alkylradikals

homolytisch spaltet. Unter Bindung des Diradikals Sauerstoff und nachfolgender Abspaltung eines Hydroperoxylradikals entsteht das Keton, z. B. **65**.

Die in Schema 3-17 beschriebene Zersetzung von Hydroperoxiden zu Alkoxy- bzw. Peroxyradikalen durch Cobaltionen ist auch Bestandteil des Kreislaufs in Abbildung 3-6 (Weg ii). Die Reaktion eines Alkoxyradikals mit NHPI generiert ein neues Molekül PINO, welches den Reaktionskreislauf weiter unterhält und ein Hydrat, welches unter Wasserabspaltung ein Keton, z. B. **65**, liefert.

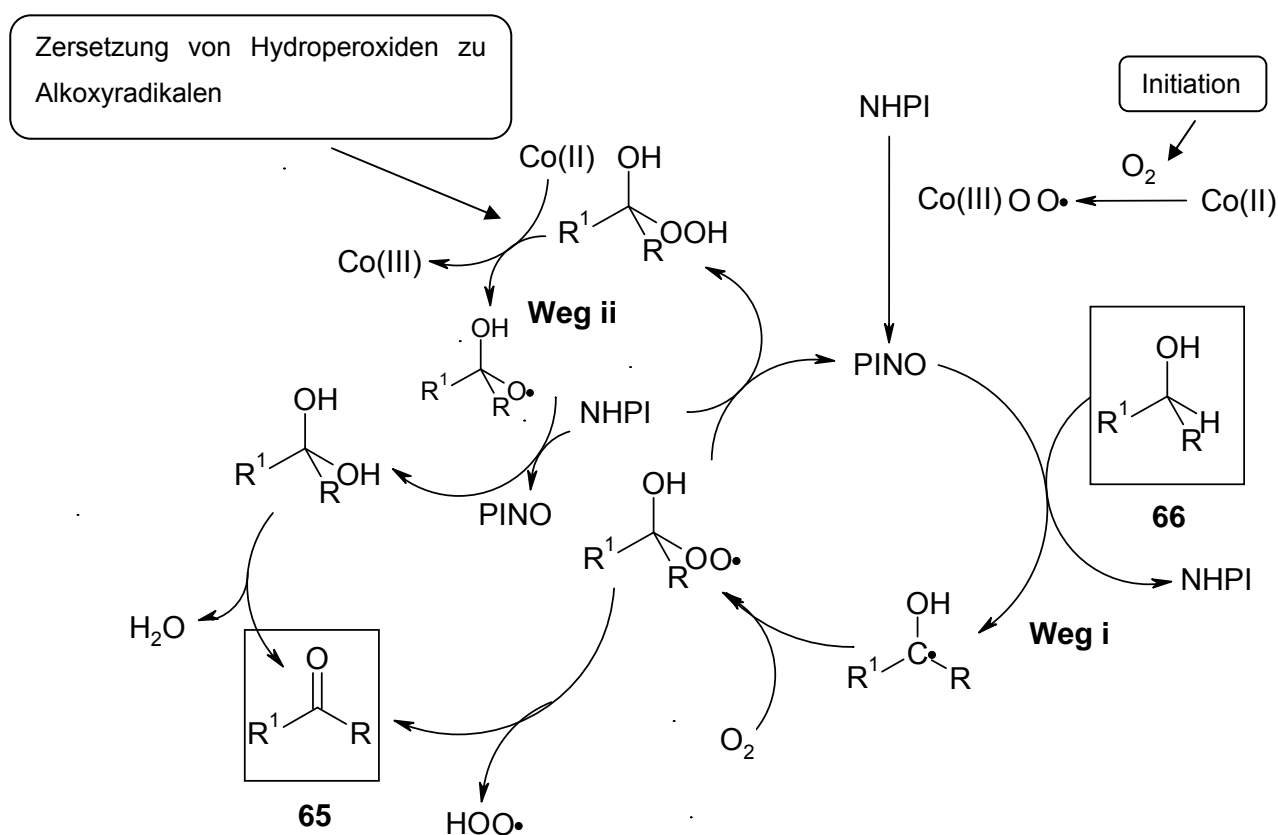


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der vorstellbaren Oxidation des Alkohols **66** zu der Carbonylverbindung **65** mit dem System NHPI/Cobalt(II)acetat/O₂ nach Recupero und Punta⁹¹

3.5.1 Analytische Untersuchungen zu Nebenprodukten der Ringverengung

Teilabschnitte des in Schema 3-24 und 3-25 postulierten Mechanismus konnten durch den Nachweis von einzelnen Intermediaten begründet werden. So wurde bei der säulenchromatographischen Auftrennung des Reaktionsgemisches zur Synthese von 8-*tert*-Butyl-2-methoxy-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22I**) das entsprechende Zwischenprodukt **66I** isoliert.

Im Vergleich zu dem ^1H -NMR-Spektrum des zur Umlagerung eingesetzten Paullons **3I** ergaben sich im Spektrum von 9-*tert*-Butyl-7-hydroxy-2-methoxy-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**66I**) leicht verschobene Signale der Protonen des Indol- und des Lactam-Stickstoffs und der sechs aromatischen Protonen. Im Spektrum fehlte das Signal für die Protonen der azepinischen CH_2 -Gruppe des Paullons **3I** bei 3.46 ppm⁷¹, stattdessen traten zwei zusätzliche Dubletts bei 5.31 und 5.46 ppm mit Kopplungskonstanten von 3.8 Hz auf. Damit zeigte das Spektrum von **66I** deutliche Parallelen zum ^1H -NMR-Spektrum von Oxazepam (**75**), welches an Position 3 eine alkoholische Funktion und ein Proton trägt. Das ^1H -NMR-Spektrum von Oxazepam zeigt zwei Dubletts bei 4.83 und 6.39 ppm mit einer Kopplungskonstante von 8.5 Hz.¹⁰⁷ Nach Zusatz von D_2O und erneuter Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums wurde das Proton der vermuteten Alkoholgruppe durch Deuterium ersetzt, und das Signal für das Proton bei 5.46 ppm verschwand wie erwartet. Das alkoholische Proton stand nicht mehr als Kopplungspartner zur Verfügung, woraufhin nur noch ein Singulett für das Proton der Methingruppe detektiert wurde (Abbildung 3-7). Für eine weitere Reinigung und vollständige Charakterisierung reichte die von **66I** isolierte Menge nicht aus.

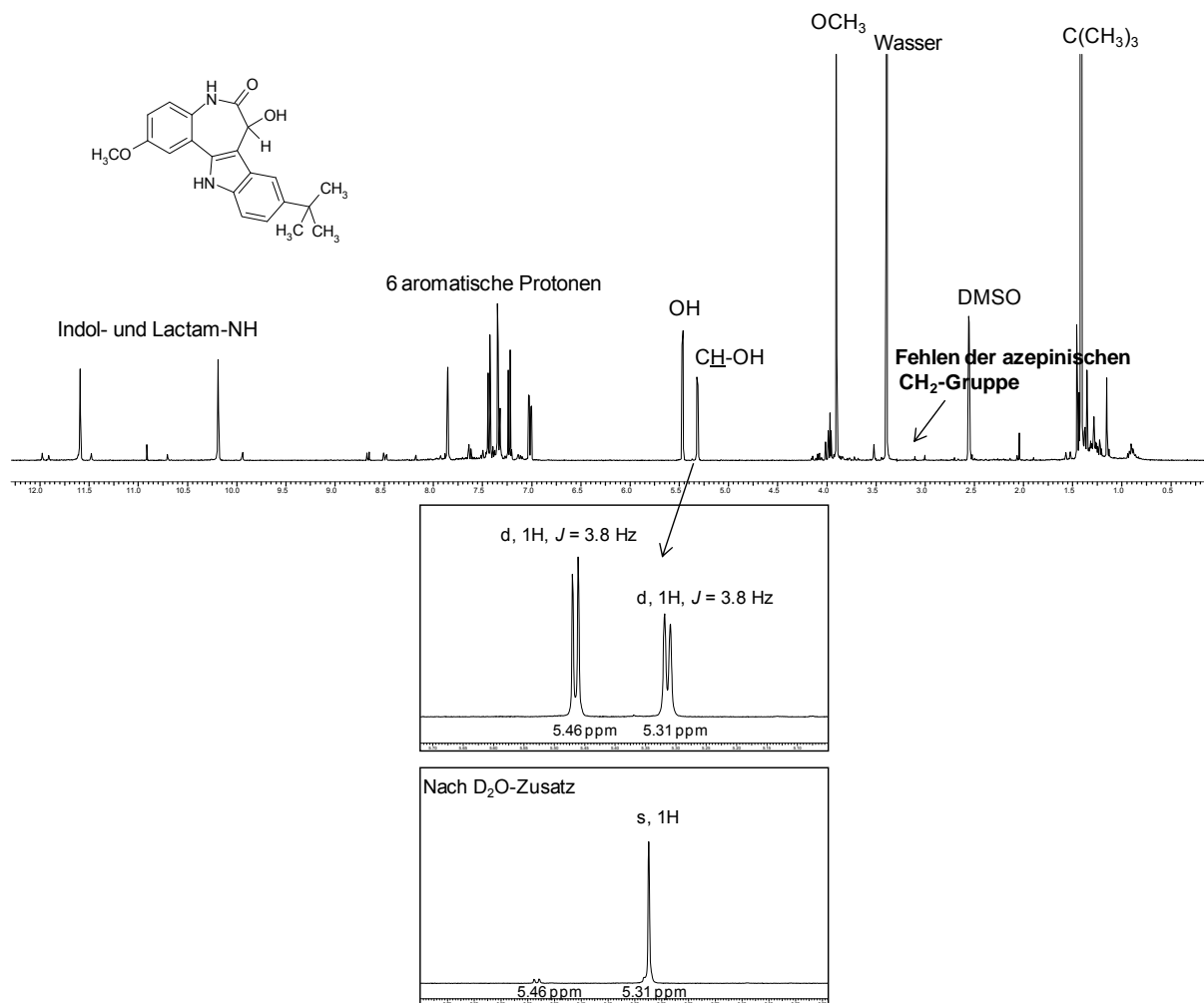


Abbildung 3-7: ^1H -NMR-Spektrum der postulierten Struktur **661**

Mit einer weiteren isolierten Fraktion der säulenchromatographischen Auftrennung wurden LC-MS-Untersuchungen durchgeführt. Das Verfahren LC-MS verbindet die Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie und ermöglicht so nacheinandergeschaltet die Auftrennung eines Gemisches und die Identifizierung der einzelnen Peaks bei geringem Substanzbedarf. Der Flüssigkeitsstrom, der die HPLC-Anlage verlässt, wird mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert und so der massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich gemacht.

In Abbildung 3-9 ist das an der analytischen HPLC-Anlage aufgenommene Chromatogramm der zu untersuchenden Fraktion dargestellt. Der Peak bei 6 Minuten konnte durch *Spiking*-Experimente eindeutig als das zur Umlagerung eingesetzte Edukt, das Paullon **3I**, identifiziert werden. Ein kleiner Vorpeak mit einer Retentionszeit von 3 Minuten ergab eine Masse von $m/z = 351.3$. Da positiv ionisiert wurde, entspricht diese Masse einem $[M + H]^+$ -Ion und einem Molekulargewicht von 350. Diese Masse kann der alkoholischen Struktur **66I** zugeordnet werden ($C_{21}H_{22}N_2O_3$, $M = 350.41$). Der Hauptpeak im Chromatogramm bei 3.5 Minuten zeigte zunächst eine Masse von 349.6. Im Verlauf des Peaks kam eine weitere Masse von 333.3 hinzu. Diese stammt nicht von Zerfallsprodukten aus 349.6, sondern von einer zweiten Substanz, die unter diesem HPLC-Peak als Verunreinigung in geringer Konzentration liegen muss. Das Molekulargewicht des Hauptpeaks von 348.6 stimmt mit der postulierten Zwischenstufe **65I** überein ($C_{21}H_{20}N_2O_3$, $M = 348.40$). Eine Zwischenstufe mit der Masse 332.3 wurde von uns bisher nicht postuliert. Da hier jedoch eine Massendifferenz von genau 2 Protonen zum Paullon vorliegt, könnte diese Masse einem Paullon-Oxidationsprodukt **78I** zugeordnet werden. Dieses Produkt **78I** könnte durch Dehydratisierung des Intermediates **66I** entstehen (Abbildung 3-8).

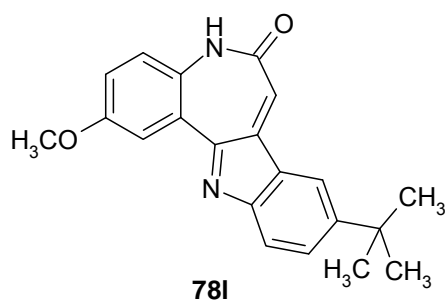


Abbildung 3-8: Postuliertes Paullon-Oxidationsprodukt **78I**

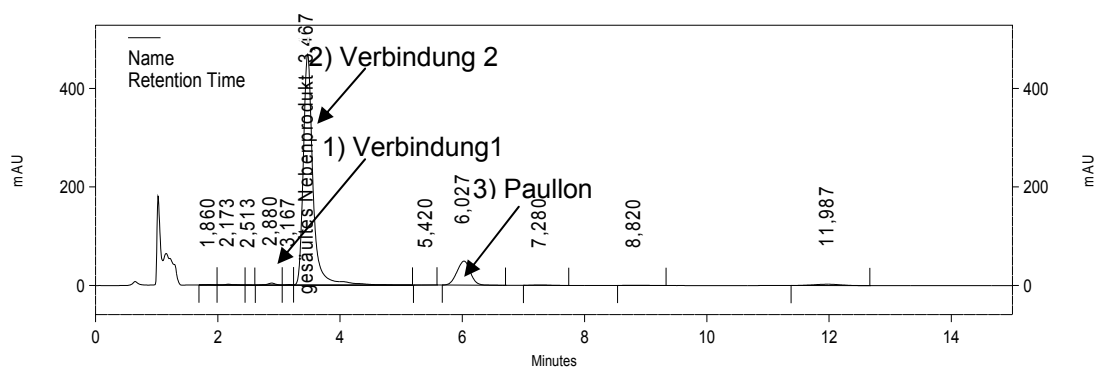
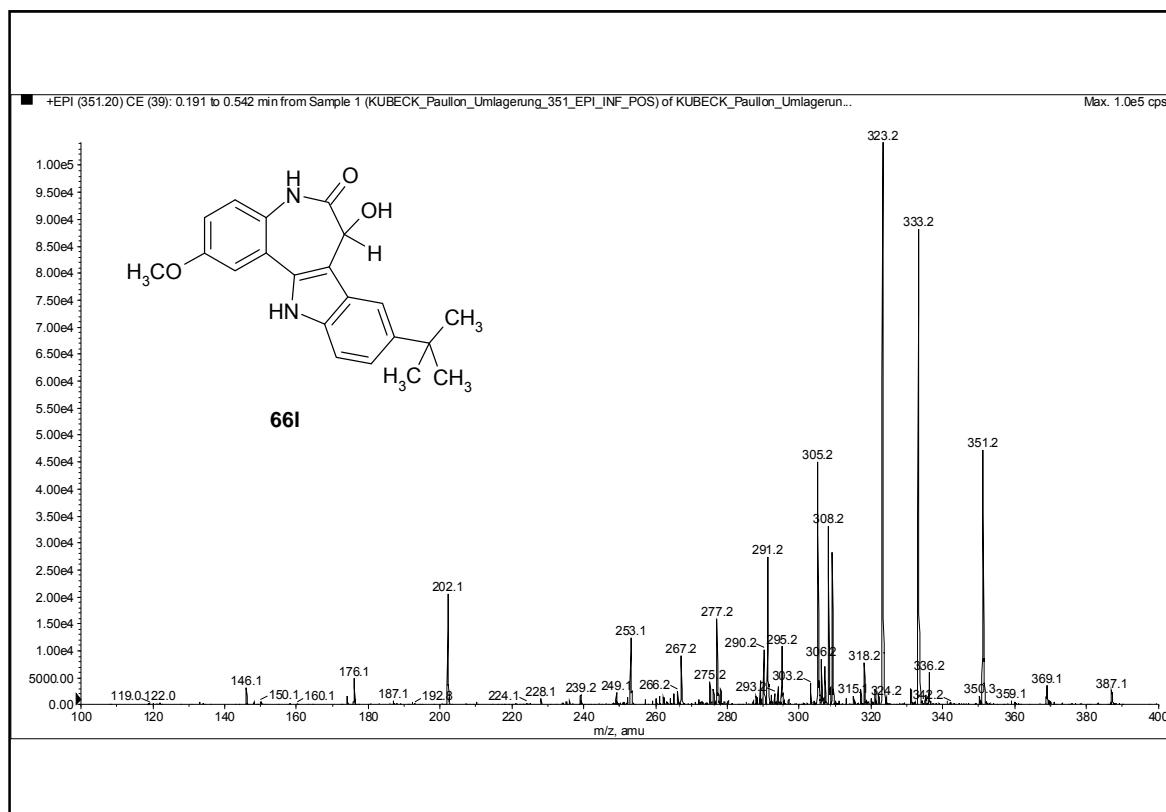


Abbildung 3-9: HPLC-Chromatogramm der Fraktion für die spätere LC-MS-Messung

In Abbildung 3-10 sind die zu den HPLC-Signalen 1 und 2 gehörenden Massenspektren dargestellt. Die postulierte alkoholische Verbindung **66I** zeigt einen Molpeak von 351.2, welcher dem unfragmentierten Molekülion entspricht. Nach Abspaltung von Wasser und Kohlenstoffmonoxid werden Fragmente mit den Massen 333.2 und 323.2 detektiert. Die Abspaltung eines Wassermoleküls ($M = 18$) ist typisch für Alkohole und Ketone, und Kohlenstoffmonoxid ($M = 28$) entweicht häufig bei Lactamen. Das Massenspektrum für **65I** zeigt den erwarteten Molpeak von 349.2 und wie die ähnliche Struktur **66I** Fragmente, die aus den beschriebenen Abspaltungen resultieren könnten.



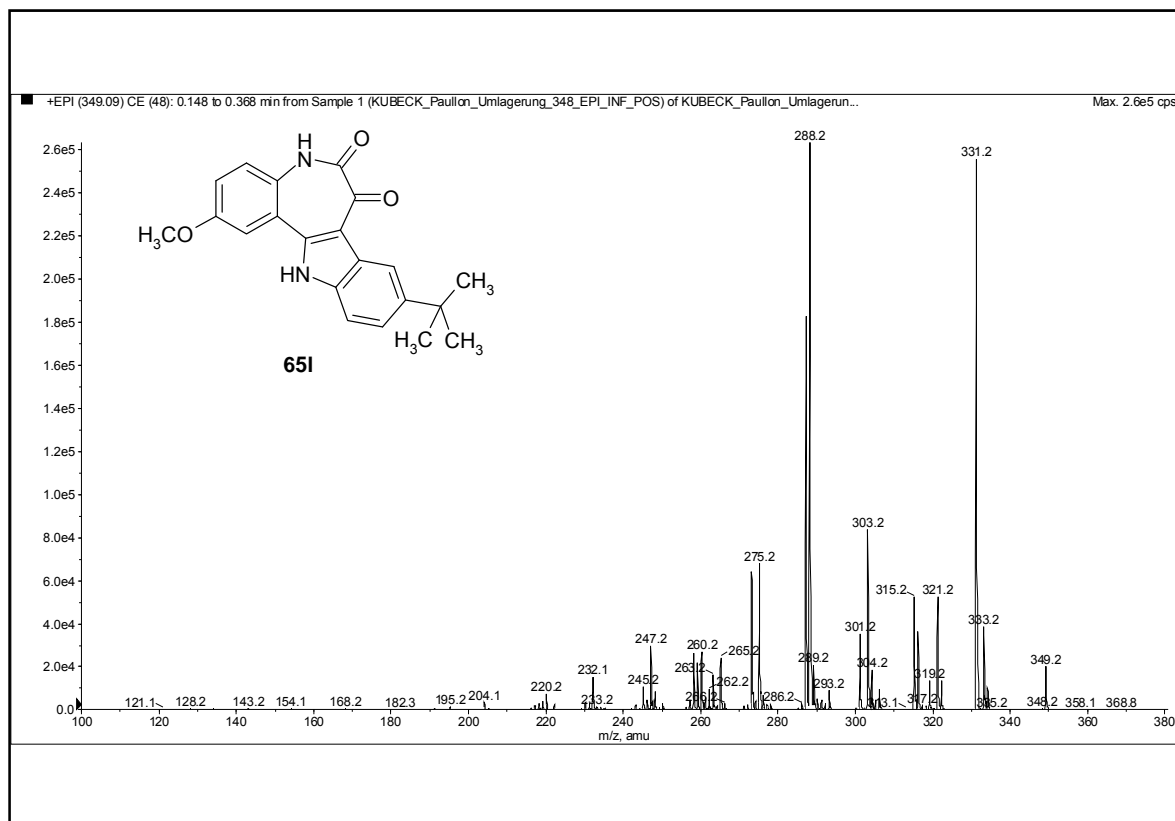
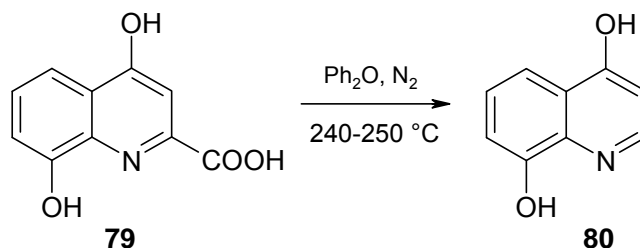


Abbildung 3-10: Massenspektren der HPLC-Signale 1 und 2, die den postulierten Strukturen **66I** und **65I** zugeordnet werden

Von der Fraktion wurde ein hochaufgelöstes Massenspektrum aufgenommen. Obwohl die alkoholische Struktur **66I** nur in sehr geringer Menge in der Fraktion vorhanden war, war ihr Molekölion am leichtesten zu detektieren und konnte eindeutig über das HRMS-Spektrum identifiziert werden.

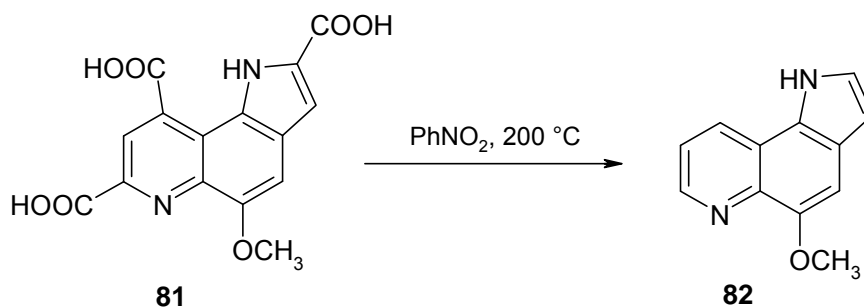
3.6 Decarboxylierung von 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren

Vertreter der Stoffklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** sollten im Rahmen dieser Arbeit zu den analogen decarboxylierten 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolinen **30** umgesetzt werden. Viele Veröffentlichungen beschreiben die Decarboxylierung von diversen Chinolincarbonsäuren in hoch siedenden Lösemitteln, wie z. B. Diphenylether.¹⁰⁸⁻¹¹² Die Arbeitsgruppe um Heiskanen synthetisierte 4,8-Dihydroxychinolin (**80**) durch zweistündiges Erhitzen der entsprechenden Chinolin-2-carbonsäure **79** auf 240-250 °C in Diphenylether unter Stickstoff-Atmosphäre (Schema 3-29).¹¹⁰



Schema 3-29: Decarboxylierung in Diphenylether¹¹⁰

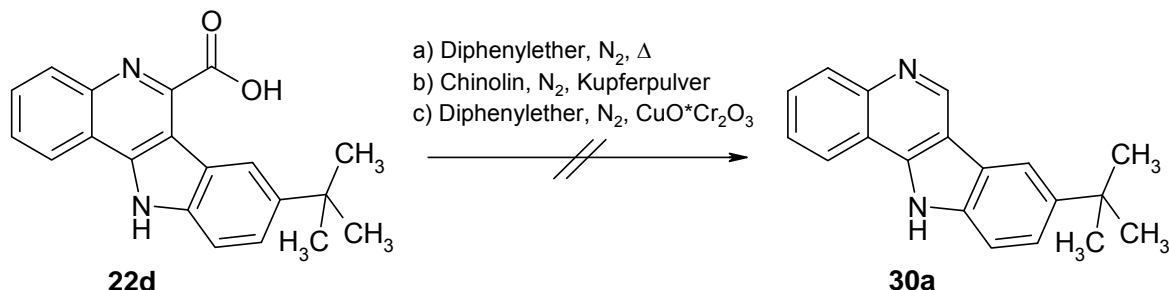
Itoh decarboxylierte die 5-Methoxy-1*H*-pyrrolo[2,3-*f*]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure (**81**) in Nitrobenzol bei 200 °C in ein bis zwei Stunden vollständig zu **82** (Schema 3-30).^{108, 109}



Schema 3-30: Decarboxylierung in Nitrobenzol¹⁰⁸

Schultz decarboxylierte eine Pyridincarbonsäure in Chinolin unter Zusatz eines Kupferchromit-Katalysators.⁶⁷

In Schema 3-31 sind die verschiedenen Versuche dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit zur Decarboxylierung von 8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22d**) durchgeführt wurden.

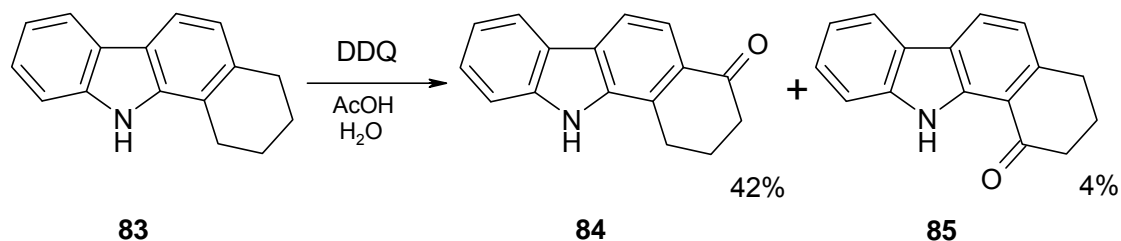


Schema 3-31: Versuche zur Decarboxylierung der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure **22d**

Die Verbindung **22d** löste sich in der Siedehitze weder in Diphenylether noch in Chinolin. Nach mehreren Stunden des Erhitzens zum Reflux gingen Teile des Feststoffs von **22d** in Lösung. Durchgeführte Inprozesskontrollen mit Hilfe von Dünnschichtchromatogrammen und HPLC-Messungen zeigten die Entstehung eines neuen Produktes. Auch nach 5-tägigem Erhitzen zum Rückfluss in reinem Diphenylether unter Stickstoff-Atmosphäre (Schema 3-31a) war das Edukt noch vorhanden. Die Reaktion wurde abgebrochen und der Ansatz säulenchromatographisch aufgetrennt. Die aufgefundenen Fraktionen ergaben nur wenige Milligramm eines Produktes, dessen NMR-Spektren aufgrund der starken Verunreinigungen nicht zu interpretieren waren. Die durchgeführten Versuche in Chinolin und in Diphenylether unter Zusatz des Kupferchromitkatalysators (Schema 3-31b und c) führten ebenfalls nicht zur Isolierung des gewünschten Produktes **30a**. Ein Derivat **30b** der allgemeinen Struktur **30** wurde daher im Verlauf der vorliegenden Arbeit auf einem anderen Syntheseweg erschlossen (Kapitel 3.9).

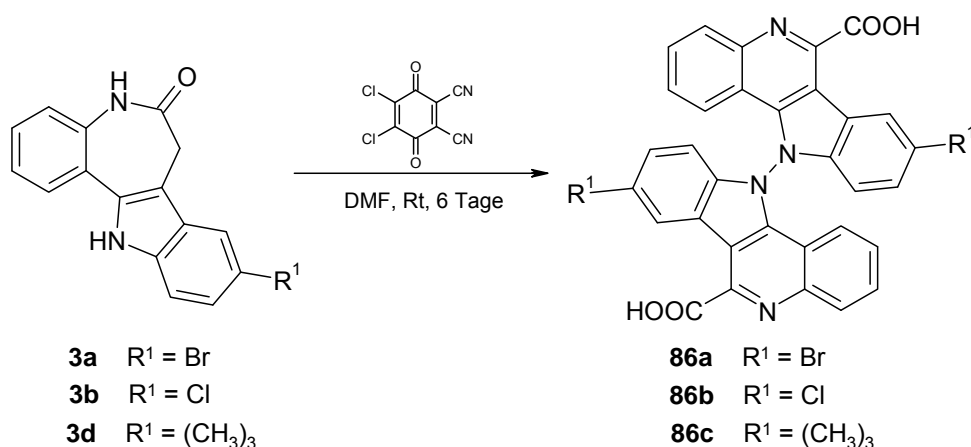
3.7 *N,N'*-Bis-(11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren)

Dufour und Kirsch gelang die regioselektive Oxidation des Carbazolderivates **83** zum entsprechenden Keton **84** mit einer kleinen Verunreinigung durch das Isomer **85**. Sie setzten **83** mit einem dreifachen Überschuss DDQ (2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon) in wässriger Essigsäure zum gewünschten Produkt **84** um (Schema 3-32).⁸⁷



Schema 3-32: Selektive Oxidation mit DDQ⁸⁷

Das Oxidationsmittel DDQ wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit dem Ziel verwendet, die azepinische CH₂-Gruppe des Benzazepinonkörpers der Paullone **3** selektiv zum Keton **65** zu oxidieren und so die anschließende Ringverengung zu den Chinolincarbonsäuren **22** zu bewirken. Wie bereits in Tabelle 3-3 dargestellt, blieb die Bildung der gewünschten Produkte **22** bei dieser Synthese aus. Ein hell-gelber, äußerst schwer löslicher, unbekannter Niederschlag wurde isoliert. Zur Aufnahme von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren war für eine ausreichende Löslichkeit des unbekannten Produkts in DMSO die Zugabe einiger Tropfen Trifluoressigsäure nötig. Die Spektren zeigten ähnliche Signale wie die der Chinolincarbonsäuren **22**. Allerdings fehlte das Signal für das Proton des Indol-Stickstoffs, und die Aufspaltungen der aromatischen Protonen unterschieden sich von denen von **22**. Strukturen, deren Spektren mit den hier beschriebenen Spektren übereinstimmen, wurden bereits von Kohfeld beschrieben.³³ Bei Stabilitätsuntersuchungen mit Kenpaullon (**3a**) in DMSO-Lösungen konnten über einen Zeitraum von 48 Wochen verschiedene oxidativ bedingte Abbauprodukte identifiziert werden. Die Chinolincarbonsäure **22a** wurde als Zwischenprodukt nach 16 Wochen mittels HPLC eindeutig identifiziert. Nach weiterer Lagerung nahm ihr Anteil am Reaktionsgemisch stetig ab, und ein weiteres unbekanntes Abbauprodukt **86a** wurde entdeckt. Das Fehlen des Signals für das Proton am Indol-Stickstoff und Veröffentlichungen über oxidativ über eine Stickstoff-Stickstoff-Bindung dimerisierte Indol-Derivate^{113, 114} veranlassten Kohfeld, für **86a** die in Schema 3-33 abgebildete Struktur zu postulieren. Außerdem konnte Kohfeld unter oxidativen Bedingungen (Zusatz von Salpetersäure und Eisessig) aus den Monomeren, den Chinolincarbonsäuren **22**, die Strukturen **86** darstellen. Die Reaktion von Paullonen mit einem dreifachen Überschuss DDQ in DMF bei Raumtemperatur und Kontakt zu Luftsauerstoff führte ebenfalls zu den postulierten Strukturen **86** (Schema 3-33).

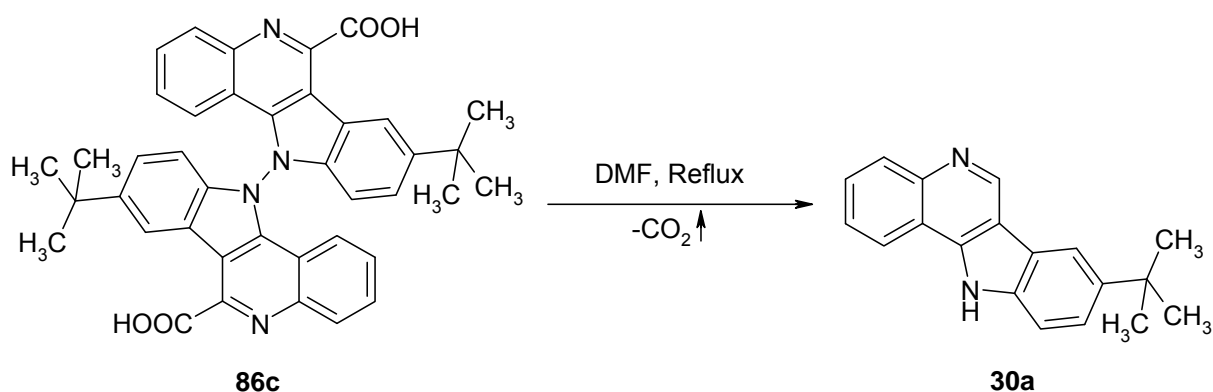


Schema 3-33: Oxidation von Paullonen **3** mit DDQ

3.7.1 Spektroskopische Untersuchungen der Oxidationsprodukte von 11H-Indolo[3,2-c]chinolin-6-carbonsäuren

Die Verbindungen **86a-86c** zeigten in NMR-Spektren wie die Chinolincarbonsäuren **22** Signale für sieben aromatische Protonen und ein Signal im tiefen Feld für das Proton der Säurefunktion. Allerdings war kein Signal für das Proton am Indol-Stickstoff zu erkennen. An der HPLC ließen sich die Verbindungen **86** von den Chinolincarbonsäuren **22** trennen. Auch die in der HPLC aufgenommenen UV-Spektren unterschieden sich deutlich. Die Löslichkeiten der Verbindungen **86** waren im Vergleich zu den schon schwerlöslichen Verbindungen **22** noch schlechter. Umkristallisationsversuche scheiterten. Ein interessantes Phänomen wurde bei dem Versuch, die Verbindung **86c** aus DMF umzukristallisieren, beobachtet. Die Verbindung wurde in wenigen ml DMF aufgeschlämmt und langsam erhitzt. In der Siedehitze wurde die Suspension schlagartig klar. Eine HPLC-Untersuchung dieser Lösung zeigte die Zersetzung der postulierten Struktur **86c** und die Entstehung einer unbekannten Verbindung **30a**. Die Struktur von **30a** konnte mit Hilfe von NMR-Spektren (auch zweidimensionale H, H-Cosy-Spektren), deren Vergleich mit Literaturdaten¹¹⁵ und einem hochaufgelösten Massenspektrum eindeutig als 8-*tert*-Butyl-11H-indolo[3,2-c]chinolin identifiziert werden (Schema 3-34). In Kapitel 3.9 wird die Darstellung von 11H-Indolo[3,2-c]chinolinen **30** über die Palladium-katalysierte Zyklisierung von Anilinochinolinen **28** erläutert. Das charakteristische NMR-Signalmuster der auf diesem Weg erhaltenen Struktur **30b** stimmte mit dem von **30a** überein.

Nähere Aussagen über die Ursachen der „reduktiven Decarboxylierung“ können nicht gemacht werden.



Schema 3-34: Zersetzung der Struktur **86c** in refluxierendem DMF

Die Versuche, aus den Massenspektren der postulierten Strukturen **86** plausible Schlüsse zu ziehen, sind bis jetzt gescheitert. Bei den EI- und ESI-Messungen von **86b** und **86c** konnten lediglich deren Monomere **22b** und **22d** detektiert werden. Über ähnliche Beobachtungen berichtete Kohfeld bei den massenspektrometrischen Untersuchungen von **86a** und **86b**, bei denen die decarboxylierten Monomere der allgemeinen Struktur **30** detektiert wurden.³³ Die Veröffentlichungen von Askam¹¹⁶ und von Ponce¹¹⁷ beschreiben bei ihren Bis-Indolstrukturen auch die Detektion der Monomere im Massenspektrum. Eine Röntgenkristallstrukturanalyse von **86** könnte die Struktur endgültig aufklären. Die Herstellung geeigneter Kristalle von Verbindungen der Grundstruktur **86** ist bisher nicht gelungen. Nach der Diffusionsmethode in den Systemen DMSO/Ethanol oder DMSO/Aceton produzierte Präzipitate von **86c** waren amorph und damit für eine Röntgenkristallstrukturanalyse ungeeignet.¹¹⁸

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die Struktur der Verbindungen **86** im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig bewiesen werden konnte.

3.8 Darstellung von substituierten Chinolinen, Chinaldinen und Chinolin-2-carbonsäuren

4-Anilinochinoline sind wichtige Strukturelemente in der medizinischen Chemie. Therapeutisch wirksame Substanzen zur Behandlung von z. B. Krebs, Malaria, Morbus Alzheimer und gastrointestinalen Ulzera enthalten diese chemische Grundstruktur.¹¹⁹⁻¹²² Die kommerziell verfügbaren Verbindungen **24** und **27** (Abbildung 3-11) sind Chinolin-2-carbonsäuren, die in Position 4 über einen Stickstoff verknüpft voluminöse Substituenten tragen und eine hohe inhibitorische Aktivität an der mitochondrialen Malatdehydrogenase zeigten (Kapitel 4.1.4). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten an Position 4 des Chinolinrings anilinsubstituierte Verbindungen **28** und deren analoge Chinolin-2-carbonsäuren **29** synthetisiert werden. Aus deren inhibitorischer Wirkung sollten mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet werden.

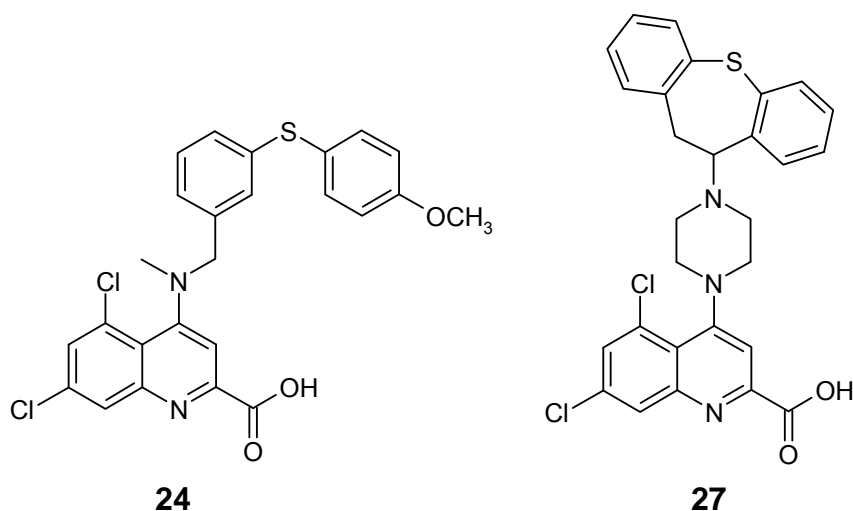
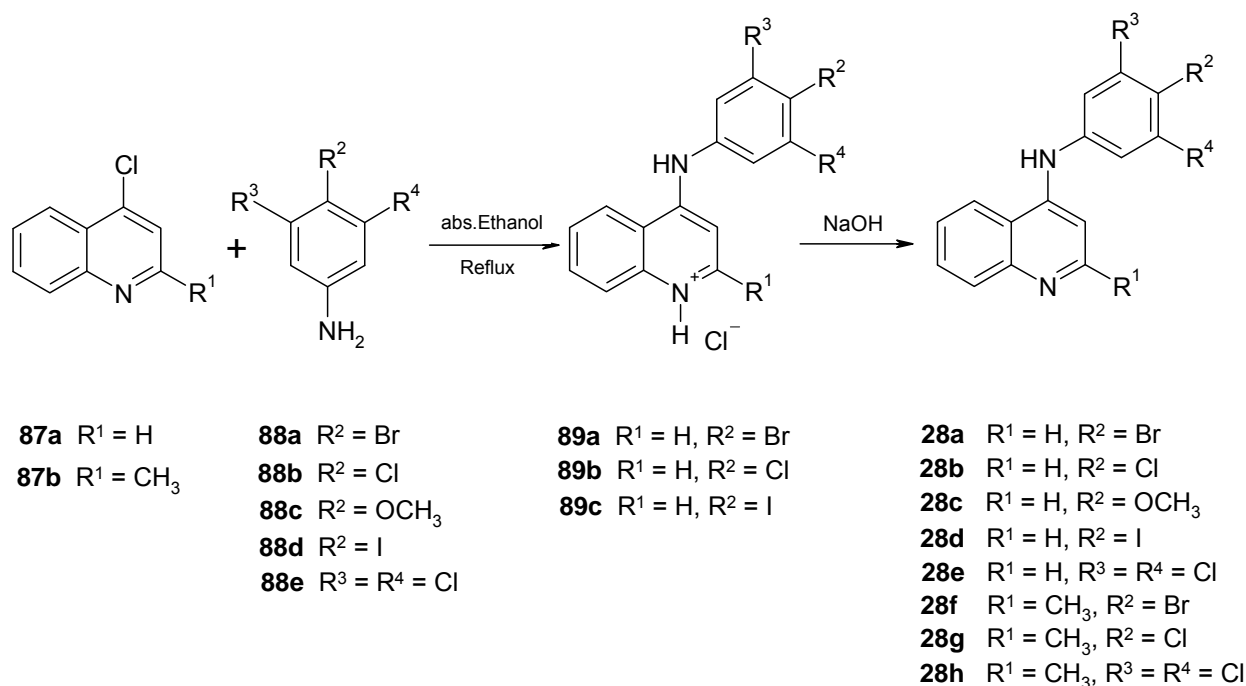


Abbildung 3-11: Strukturen der kommerziell erworbenen Chinolin-2-carbonsäuren **24** und **27**

Die Darstellung der Verbindungen erfolgte über eine nukleophile Substitution am Aromaten des 4-Chlorchinolins (**87a**) mit unterschiedlich substituierten Anilinderivaten. Die Arbeitsgruppe um Dhanabal erhitzte das 4-Chlorchinaldin (**87b**) mit äquimolaren Mengen an Anilinen **88** in absolutem Ethanol für 12 Stunden zum Rückfluss und konnte nach säulenchromatographischer Reinigung das Anilinochinolinderivat isolieren.¹²⁰ Avetisyan führte die erfolgreiche Umsetzung von 4-Chlorchinaldin (**87b**) mit Anilinen **88** in salzsaurem Ethanol durch.^{123, 124} Im Rahmen

dieser Arbeit wurden verschiedene Anilinochinoline **28** nach der Methode von Dhanabal synthetisiert (Schema 3-35).

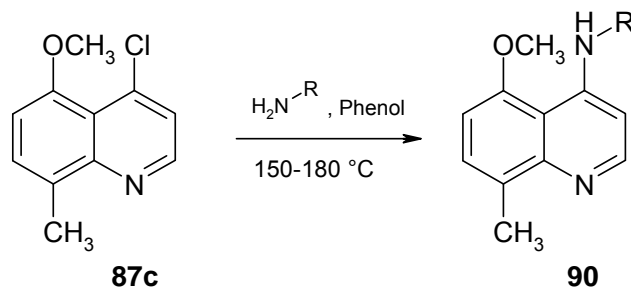


Schema 3-35: Synthese der Anilinochinoline **28**

Nach vollständiger Umsetzung der Edukte **87** und **88** wurde der absolute Ethanol im Vakuum entfernt und der Rückstand **89** in wässriger Natronlauge aufgeköcht. Anschließend wurden die Produkte **28** aus dem angegebenen Lösemittel umkristallisiert. Die Zwischenprodukte **89a-c** wurden zusätzlich isoliert und beschrieben, da die CHN-Analysen der freien Basen **28a**, **b** und **d** aufgrund von vermutlich hygroskopischen Eigenschaften abwichen. Wie erwartet zeigten die analogen Salze **89** keine Probleme bei den Verbrennungsanalysen.

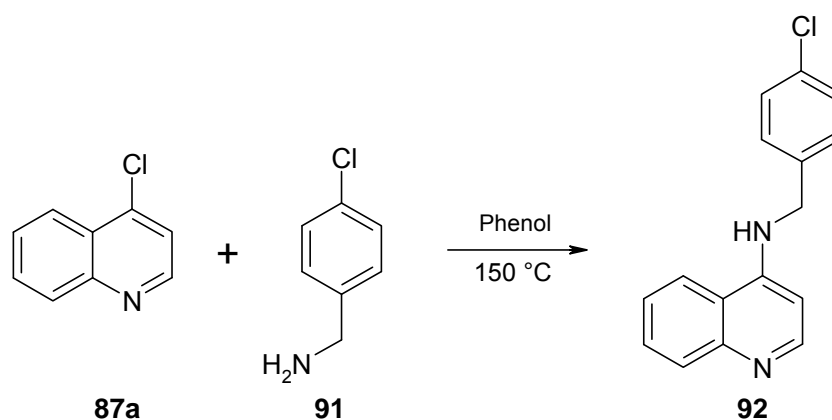
4-Chlorchinolin (**87a**) sollte außerdem mit 4-Chlorbenzylamin (**91**) umgesetzt werden, um in Anlehnung an Verbindung **24** eine Methylenbrücke zwischen den Stickstoff und den aromatischen Ring einzuführen. Die für die Synthese von **28** verwendeten Reaktionsbedingungen führten zu keiner Umsetzung von **87a** mit 4-Chlorbenzylamin (**91**). Nach einer Vorschrift von Galanakis wurde **87a** mit einem Überschuss **91** in n-Pentanol in Gegenwart von Tetramethylethylendiamin und unter Stickstoff-Atmosphäre zum Rückfluss erhitzt.¹²⁵ Auch hier bildete sich nicht das gewünschte Produkt

92. Meyer setzte das 4-Chlorchinolinderivat **87c** mit verschiedenen Aminen, auch mit Benzylamin, in Phenol bei 150 °C zu den Verbindungen **90** um (Schema 3-36).¹²⁶



Schema 3-36: Nukleophile Substitution des Chlors in **87c** durch verschiedene Amine in Phenol¹²⁶

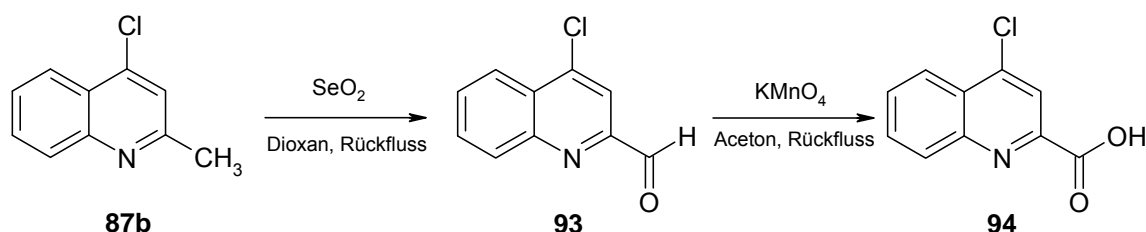
Diese von Surrey¹²⁷ als „Phenolmethode“ bezeichnete Synthese führte zur Bildung des gewünschten Produkts **92** (Schema 3-37).



Schema 3-37: Reaktion von 4-Chlorchinolin (**87a**) und 4-Chlorbenzylamin (**91**) in Phenol

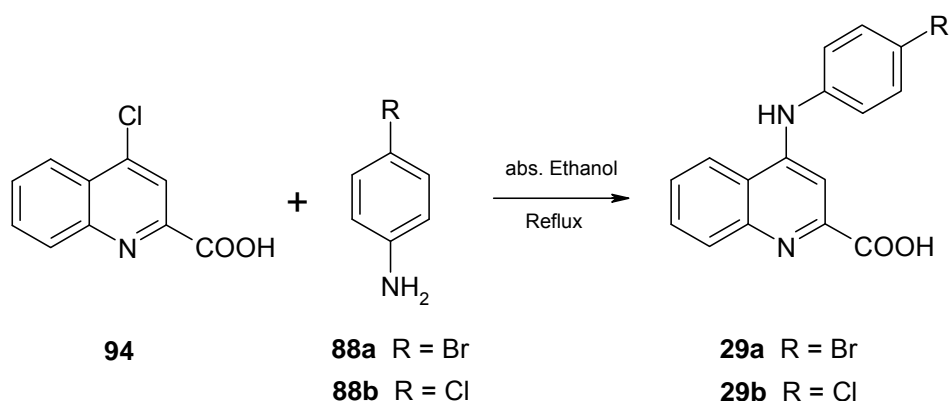
Um die gewünschte Carboxylfunktion in Position 2 des Chinolingrundkörpers einzubringen, wurde 4-Chlorchinaldin (**87b**) in zwei Stufen zu der 4-Chlorchinolin-2-carbonsäure (**94**) oxidiert. Varlet und Mitarbeiter erhitzen 4-Chlorchinaldin mit einem 1.2 fachen Überschuss Selendioxid in Dioxan zum Rückfluss. Der Aldehyd **93** konnte unter diesen Bedingungen leicht gewonnen werden.

Für die Oxidation des Aldehyds **93** zur Carbonsäure **94** mit Kaliumpermanganat musste die Vorschrift nach Varlet¹²⁸ in mehrfacher Hinsicht abgewandelt werden. Zum einen wurde nicht bei Raumtemperatur, sondern in der Siedehitze gearbeitet, zum anderen wurde das Produkt **94** vom entstandenen Braunstein durch Waschen mit heißem Acetonitril abgetrennt (Schema 3-38).



Schema 3-38: Zweistufige Oxidation von 4-Chlorchinaldin (**87b**) zur 4-Chlorchinolin-2-carbonsäure (**94**)

94 konnte analog zu Schema 3-35 mit Anilinen **88** in absolutem Ethanol zu den neuen Chinolincarbonsäuren **29a** und **b** umgesetzt werden (Schema 3-39).



Schema 3-39: Umsetzung der 4-Chlorchinolin-2-carbonsäure (**94**) mit Anilinen **88**

Im tiefen Feld der ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **29** fehlte das Signal für das Proton der Carboxylfunktion zwischen 12 und 14 ppm. Den NMR-Daten anderer veröffentlichter Chinolin-2-carbonsäuren fehlt dieses Signal auch.^{129, 130} Die Begründung dafür könnte in der Einbindung dieses Protons in eine Wasserstoffbrücke zwischen Carboxylfunktion und Chinolin-Stickstoff liegen. Dadurch könnte das Signal so stark verbreitert auftreten, dass es nicht mehr zu detektieren ist. Alle anderen Protonen der Verbindungen waren eindeutig zuzuordnen. Die vier aromatischen Protonen der Anilinsubstituenten zeigten ein AA'XX'-System. Fünf weitere Protonen waren dem Chinolinring zuzuordnen. Das Proton in Position 3 verursachte ein Singulett und war im Gegensatz zu den Protonen der analogen Chinaldinverbindungen **28f** und **g** (6.90 ppm) in das tiefe Feld (7.31 ppm) verschoben. Auch das Signal für das anilinische Proton war von 8.90 ppm (Chinaldinverbindung **28f**) nach 10.25 ppm (Chinolin-carbonsäure **29a**) verlagert. Diese Beobachtungen lassen sich durch den elektronenziehenden Effekt der Carboxylfunktion in α -Position zum Chinolin-Stickstoff erklären.

3.9 Darstellung von 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolinen durch Palladium-induzierten Ringschluss

Verbindungen, die einen 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-Grundkörper enthalten, werden in der Literatur als potentielle Antitumorwirkstoffe beschrieben.^{115, 131} Die Verbindung IQDMA (**95**, *N'*-(11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-yl)-*N,N*-dimethylethan-1,2-diamin) induziert G2/M-Zellzyklusarrest, reguliert die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 hoch und hemmt das Wachstum verschiedener humaner Krebszelllinien.^{132, 133}

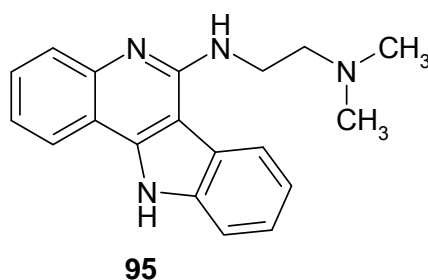
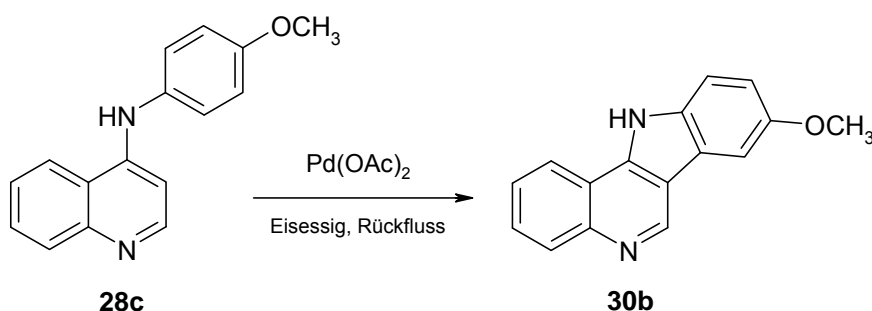


Abbildung 3-12: Struktur von IQDMA (**95**)

Derivate des 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-Grundkörpers lassen sich durch vielfältige Methoden darstellen, die zumeist auf zwei alternativen Ringschlussstrategien basieren. Einige Arbeitsgruppen zyklisieren Aminophenylindole und erhalten durch Pyridinringschlüsse 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinoline.^{134, 135} Andere Synthesen bilden den Grundkörper über einen finalen Ringschluss zum Indol durch z. B. Fischer-Indol-Synthese,¹³⁶ eine Graebe-Ullmann-Synthese¹³⁷ oder die Zyklisierung von Anilinochinolinen.^{115, 120} Nach He wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit 1 Äquivalent Anilinochinolin **28c** mit 1 Äquivalent Palladium(II)acetat in Eisessig unter Stickstoff-Atmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach säulenchromatographischer Auftrennung des entstandenen Reaktionsgemisches konnte **30b** in geringer Ausbeute (9%) isoliert werden. Der Vergleich der mMDH-inhibitorischen Wirkungen von **30** mit denen der analogen Chinolincarbonsäuren **22** sollte zeigen, ob die Carboxylfunktion essentiell für die enzyminhibitorische Wirkung ist (Kapitel 4.1.5).



Schema 3-40: Palladium-induzierter Ringschluss des Anilinochinolins **28c**

Die Arbeitsgruppe um He diskutierte die mögliche Entstehung eines Regioisomers zu **30b**. Das Vorliegen der Struktur **96** konnte über zweidimensionale Protonenkorrelationen (H,H-COSY-Spektrum) ausgeschlossen werden. Der Vergleich der NMR-Daten von He mit denen dieser Arbeit bestätigte auch hier das Vorliegen der Struktur **30b**.

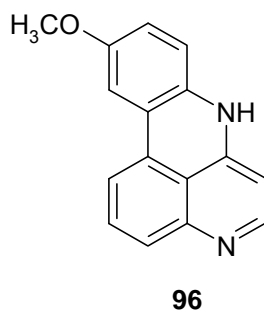


Abbildung 3-13: Struktur des möglichen Regioisomers **96**

4 Biologische Aktivität

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und die Testung der biologischen Aktivität von selektiven Inhibitoren NAD^+ -abhängiger Enzyme.

Dazu sollten alle synthetisierten Verbindungen zunächst auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der NAD^+ -abhängigen mitochondrialen Malatdehydrogenase (mMDH) an einem im Arbeitskreis von Conrad Kunick etablierten Testsystem überprüft werden. Ausgewählte Verbindungen wurden von der Arbeitsgruppe von Manfred Jung in Freiburg an NAD^+ -abhängigen Histondesacetylasen der Klasse III, den Sirtuinen, getestet (Kapitel 4.2). Zur Überprüfung der Selektivität wurden einige Verbindungen in den Laboratorien von Laurent Meijer (Station Biologique, Roscoff, Frankreich) auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität an verschiedenen ATP-abhängigen Kinasen getestet (Kapitel 4.3). Die antiproliferative Aktivität einiger Verbindungen wurde vom National Cancer Institut (NCI, USA) an 60 humanen Krebszelllinien überprüft (Kapitel 4.4).

4.1 Malatdehydrogenase-inhibitorische Aktivität

4.1.1 Testsystem und Messprinzip

Die Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die Umwandlung von L-Malat in Oxalacetat bzw. die entsprechende Rückreaktion. Bei der oxidativen Umwandlung von L-Malat in Oxalacetat werden Reduktionsäquivalente auf den Cofaktor NAD^+ übertragen, und NADH/H^+ entsteht. Die Menge an entstehendem NADH/H^+ pro Zeiteinheit ist ein Maß für die Umsetzungsgeschwindigkeit der Reaktion, also ein Maß für die enzymatische Aktivität der MDH. Die Entstehung von NADH/H^+ kann spektralphotometrisch bei dem Absorptionsmaximum der Struktur ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) verfolgt werden. Das Nikotinamidadenindinukleotid besitzt sowohl in seiner reduzierten als auch in seiner oxidierten Form einen Adeninring, der für das gemeinsame Absorptionsmaximum der beiden Strukturen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ verantwortlich ist. Die Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ führt zur Ausbildung eines Enaminon-Systems und sorgt für eine bathochrome Verschiebung des Absorp-

tionsmaximums zu 340 nm. Bei dieser Wellenlänge kann NADH/H⁺ selektiv untersucht werden, da NAD⁺ hier kein Absorptionsmaximum besitzt (Abbildung 4-1).

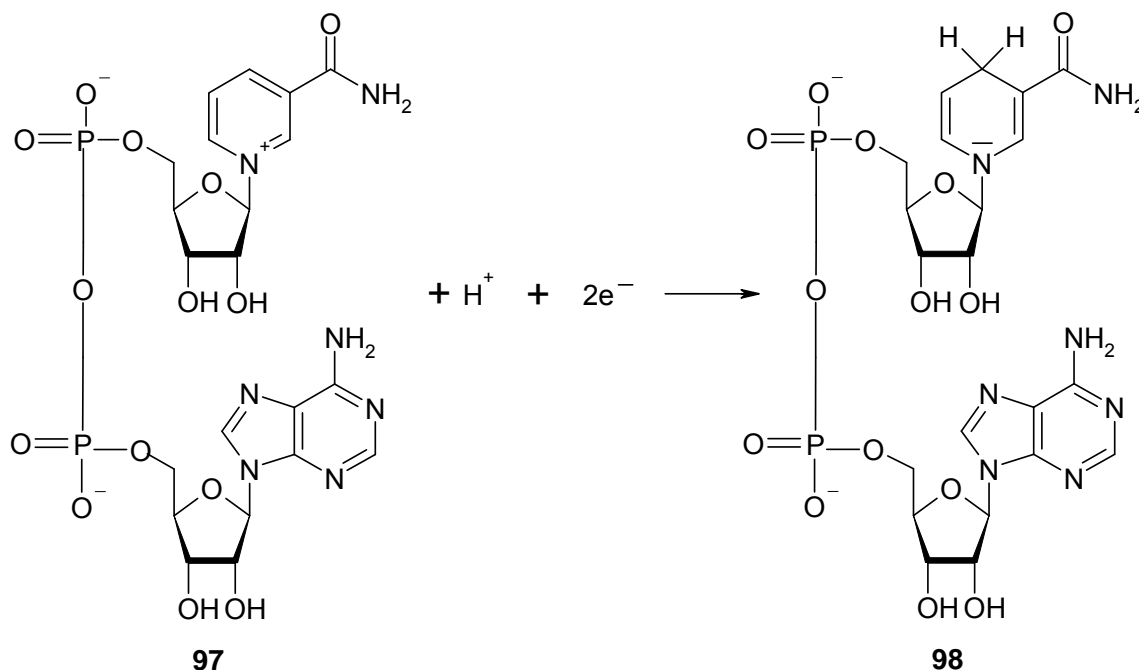
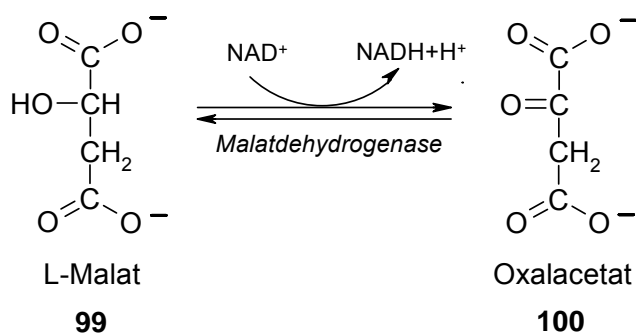


Abbildung 4-1: Reduktion von NAD⁺ zu NADH, Veränderung des chromophoren Systems am Nikotinamidring



Schema 4-1: Oxidation von L-Malat zu Oxalacetat unter Katalyse der Malatdehydrogenase

Kohfeld etablierte im Rahmen ihrer Arbeit das von Meijer (Station Biologique, Roscoff, Frankreich) entwickelte UV-spektrometrische Verfahren zur Bestimmung der MDH-inhibitorischen Aktivität am Spektralphotometer SPECORD 200 (Analytik Jena) der Technischen Universität Braunschweig. Dieses Verfahren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit übernommen. Knockaert und Kohfeld stellten in ihren

Untersuchungen eine Selektivität der Paullone **3** für die mitochondriale Isoform der Malatdehydrogenase (mMDH) fest. Die zytoplasmatische MDH (cMDH) wurde von den Paullonen in wesentlich geringerem Maße inhibiert.^{31, 33} Deshalb wurden die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten potentiellen Inhibitoren nur gegen die mitochondriale Isoform (mMDH) getestet.

Bei dem verwendeten Enzym-Assay handelt es sich um einen direkten Assay, da die Entstehung eines Produktes direkt als Funktion der Zeit erfasst wird. Die Grundlage der Absorptionsspektroskopie bildet das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 4-1):^{138, 139}

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A = Absorption

ε = molarer Absorptionskoeffizient $\left[\frac{l}{mol \cdot cm} \right]$

c = molare Konzentration $\left[\frac{mol}{l} \right]$

d = Schichtdicke $[cm]$

$$\varepsilon(NADH) = 6.22 \cdot 10^3 \frac{l}{mol \cdot cm}$$

Gleichung 4-1: Lambert-Beersches-Gesetz, molarer Absorptionskoeffizient von NADH

Die Absorption korreliert direkt mit der Konzentration des untersuchten Stoffes, in diesem Fall NADH/H⁺. Der Anstieg der NADH/H⁺-Konzentration wird über einen Zeitraum von 2.5 Minuten spektralphotometrisch verfolgt. Die Umsetzungsgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion soll zwischen 55 und 70 mAU/min (AU = *absorption units*) liegen, da in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang $\Delta A/\Delta t$ besteht.³³ Die Umsetzungsgeschwindigkeit, die bei Messungen ohne Inhibitor detektiert wird, entspricht der ungehemmten Enzymaktivität und wird mit 100% gleichgesetzt. Bei Anwesenheit eines Inhibitors wird die Enzymaktivität gehemmt. Die Umsetzungsgeschwindigkeit und damit die Zunahme von NADH/H⁺ über den gemessenen Zeitraum sinken ab. Wird die resultierende erniedrigte Umsetzungsgeschwindigkeit zur ungehemmten Geschwindigkeit ins Verhältnis gesetzt, wird die Restaktivität des Enzyms bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration erhalten:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\Delta A / \Delta t \text{ Probe [mAU/min]}}{\Delta A / \Delta t \text{ ungehemmte Enzymaktivität [mAU/min]}} \cdot 100\%$$

Gleichung 4-2: Formel zur Berechnung der Restaktivität bei einer bestimmten Konzentration an potentielltem Inhibitor

Alle im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen wurden zunächst in einer Übersichtsmessung bei einer Konzentration von 10 µM getestet. Die Restaktivitäten der mMDH nach Inkubation mit der jeweiligen Verbindung wurden nach der Formel in Gleichung 4-2 bestimmt. Die Messung bei nur einer Konzentration des potentiellen Inhibitors gibt einen ersten Hinweis auf das inhibitorische Potential der untersuchten Verbindung. Genauere Aussagen liefert die Bestimmung des IC₅₀-Wertes (IC₅₀ = *inhibitory concentration* 50%). Der IC₅₀-Wert ist diejenige Konzentration des Inhibitors, die eine halbmaximale Inhibition des Enzyms bewirkt.¹³⁸ Für die Bestimmung dieses Wertes wurden fünf bis sieben verschiedene Inhibitor-konzentrationen hergestellt und ihre Wirkungen auf die mMDH ermittelt. Die graphische Auftragung der Inhibitor-konzentration gegen die jeweiligen Restaktivitäten führt zu einer sigmoidalen Kurve. Aus dieser Kurve kann graphisch der IC₅₀-Wert ermittelt werden. Spezielle Computerprogramme, wie z. B. Graph Pad Prism®, ermitteln den Wert rechnerisch. Da IC₅₀-Werte sowohl von der Substrat- als auch von der Cosubstratkonzentration abhängig sind, sind sie als Absolutwerte nur aussagekräftig, wenn die genauen Konzentrationen dieser beteiligten Komponenten mit angegeben werden. Ein unter genau kontrollierten Messbedingungen ermittelter IC₅₀-Wert eignet sich zum Vergleich von relativen Aktivitäten mehrerer potentieller Inhibitoren am selben Enzym. Der K_i-Wert, die Inhibitionskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, ist von Enzym- und Substratkonzentration unabhängig. Er beschreibt die Affinität eines Inhibitors zum Enzym und basiert auf dem Massenwirkungsgesetz. Der K_i-Wert lässt sich mit nachfolgender Formel berechnen:

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Gleichung 4-3: Formel zur Berechnung der Inhibitionskonstante K_i ¹³⁸

Die Umrechnung von IC_{50} -Werten in die entsprechenden K_i -Werte kann mit der von Cheng und Prusoff 1973 entwickelten Gleichung 4-4 erfolgen.¹⁴⁰

$$IC_{50} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

Gleichung 4-4: Zusammenhang zwischen dem IC_{50} - und dem K_i -Wert nach Cheng und Prusoff¹⁴⁰

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Berechnung der K_i -Werte verzichtet. Die ermittelten IC_{50} -Werte wurden alle unter exakt reproduzierbaren Messbedingungen am gleichen Enzymsystem ermittelt. So kann eine Vergleichbarkeit der Werte untereinander begründet werden.

4.1.2 Inhibitorische Aktivität der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepin-6(5*H*)-one

Kohfeld stellte bei mMDH-Aktivitätsmessungen mit unterschiedlich substituierten Paullonen **3** fest, dass die Benzylierung am Lactam-Stickstoff von Kenpaullon (**3a**) zu einer guten inhibitorischen Aktivität der Verbindung **5a** führte. Die mMDH zeigte nach Inkubation mit 10 μM **5a** nur noch eine Restaktivität von 8.6%. Nach Inkubation mit Kenpaullon (**3a**) blieb die mMDH dagegen zu 74.5% aktiv.

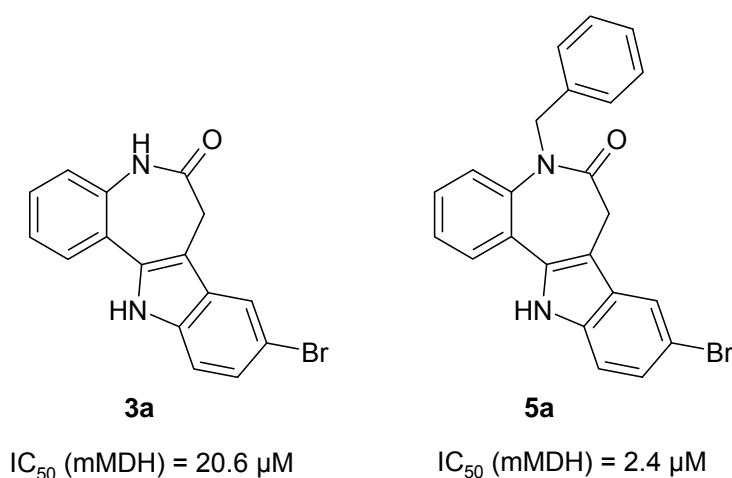
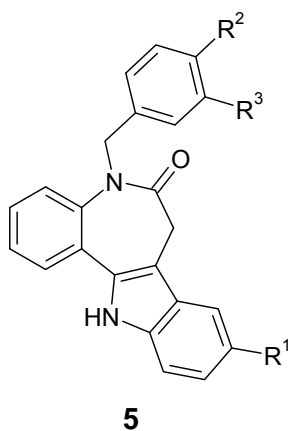


Abbildung 4-2: Gesteigerte mMDH-inhibitorische Aktivität durch Benzylierung des Kenpaullons (**3a**) am Lactam-Stickstoff

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Verbindungen der Substanzklasse **5** synthetisiert (Kapitel 3.3). Alle Vertreter **5** wurden auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der mMDH an dem im Arbeitskreis etablierten Messsystem in einer Übersichtsmessung getestet. Zeigten sich in diesen Übersichtsmessungen interessante Ergebnisse, wurden von den Verbindungen IC_{50} -Werte experimentell ermittelt (Tabellen 4-1 und 4-2).

Tabelle 4-1: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] in Anwesenheit der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **5** [10 μ M]



5	R¹	R²	R³	Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%]^a
a	Br	H	H	4.6 \pm 0.03
b	Cl	H	H	29.5 \pm 2.7
c	H	H	H	94.8 \pm 0.05
d	C(CH ₃) ₃	H	H	3.2 \pm 0.3
e	CF ₃	H	H	9.3 \pm 1.0
f	CH ₃	H	H	33.6 \pm 0.4
g	OCH ₃	H	H	62.0 \pm 1.8
h	Br	CH ₃	H	4.3 \pm 0.1
i	Br	OCH ₃	H	4.1 \pm 1.0
j	Br	Cl	H	4.1 \pm 0.2
k	Br	Cl	Cl	5.3 \pm 0.3
l	H	CH ₃	H	59.0 \pm 0.4
m	H	Cl	Cl	9.7 \pm 0.03
n	C(CH ₃) ₃	Cl	Cl	1.7 \pm 0.4

^a s_M ist der Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*), nähere Erläuterung Kapitel 7.3.1

Tabelle 4-2: mMDH-inhibitorische Aktivität der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-one **5**, IC₅₀-Werte ± s_M [μM]

5	R¹	R²	R³	IC₅₀-Wert ± s_M [μM]
a	Br	H	H	2.4 ± 0.4
b	Cl	H	H	2.7 ± 0.05
c	H	H	H	> 10
d	C(CH ₃) ₃	H	H	1.6 ± 0.1
e	CF ₃	H	H	4.2 ± 0.1
f	CH ₃	H	H	6.2 ± 1.2
g	OCH ₃	H	H	11.9 ± 0.4
h	Br	CH ₃	H	1.6 ± 0.1
i	Br	OCH ₃	H	1.8 ± 0.3
j	Br	Cl	H	1.5 ± 0.2
k	Br	Cl	Cl	1.1 ± 0.1
l	H	CH ₃	H	10.5 ± 0.1
m	H	Cl	Cl	7.9 ± 0.5
n	C(CH ₃) ₃	Cl	Cl	0.77 ± 0.02

Von der Verbindung **5c** wurde kein IC₅₀-Wert bestimmt, da bei einer Konzentration von 10 μM von **5c** die mMDH nicht inhibiert wurde (Tabelle 4-1).

Zum anschaulicheren Vergleich der IC₅₀-Werte aus Tabelle 4-2 sind in Abbildung 4-3 die pIC₅₀-Werte, die negativen dekadischen Logarithmen der molaren IC₅₀-Werte, dargestellt.

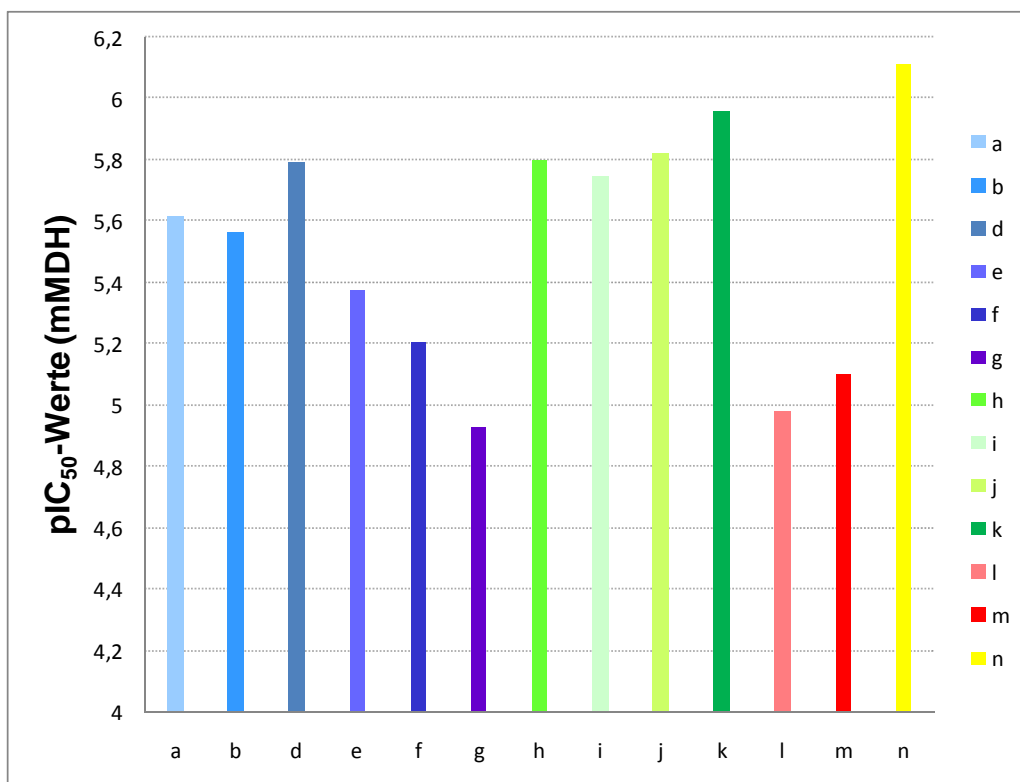


Abbildung 4-3: pIC₅₀-Werte der verschiedenen 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-one **5a-n** für die Hemmung der mMDH

Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Aus den experimentell erhobenen Daten sollten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR = *structure-activity relationships*) abgeleitet werden.

Die Säulen in Blautönen in Abbildung 4-3 zeigen die pIC₅₀-Werte der Verbindungen **5a-g**, die in Position 9 des Paullonggrundkörpers unterschiedliche Substituenten tragen. Das am Lactam-Stickstoff benzylierte Kenpaullon **5a** hat einen IC₅₀-Wert von 2,5 µM. Das 9-chlorsubstituierte Derivat **5b** zeigt eine der Leitverbindung **5a** äquivalente Wirkung gegenüber der mMDH. Verbindung **5c** ist an Position 9 unsubstituiert und zeigt keine inhibitorische Aktivität in der Übersichtsmessung bei 10 µM. Das Vorhandensein eines Substituenten in dieser Position scheint wichtig für eine Wirkung der Verbindungen **5** zu sein. Die Einführung einer Trifluormethyl- (**5e**), Methyl- (**5f**) oder Methoxygruppe (**5g**) in Position 9 bewirkt eine Verschlechterung der Aktivität der Verbindungen im Vergleich zum Brom-Analogon **5a**. Die Verbindung

5d trägt eine Tertiärbutylgruppe an dieser Position und ist unter den Verbindungen **5a-g** das aktivste Derivat.

Die grünen Säulen zeigen die pIC_{50} -Werte der Verbindungen **5h-k**. Zur Darstellung dieser Verbindungen wurde Kenpaullon (**3a**) mit verschiedenen Benzylbromidsubstituenten nach dem Schema von Topliss alkyliert (Kapitel 3.3). Die Einführung von verschiedenen Substituenten in den Benzylkern bewirkt bei allen Derivaten **5h-k** eine leichte Steigerung des inhibitorischen Potentials gegenüber der Leitverbindung **5a**, wobei das dichlorsubstituierte Derivat **5k** mit $1.1 \mu\text{M}$ den niedrigsten IC_{50} -Wert zeigt.

Die roten Säulen gehören zu den Verbindungen **5l** und **5m**, die beide in Position 9 unsubstituiert, jedoch am Benzylkern methyl- bzw. dichlorsubstituiert sind. Die Einführung von Substituenten in den Benzylkern steigert auch hier die Wirkung der Derivate gegenüber der mMDH verglichen mit der völlig unsubstituierten Struktur **5c**. Die Verbindungen sind jedoch deutlich weniger aktiv als die 9-bromsubstituierten Analoga **5h-k**.

Die Molekülvariationen der beiden besonders aktiven Vertreter **5d** und **5k**, die Tertiärbutylgruppe in Position 9 der Verbindung **5d** und der 3,4-Dichlorbenzylsubstituent der Verbindung **5k**, wurden miteinander kombiniert. Die resultierende Verbindung **5n** ist mit einem IC_{50} -Wert von $0.8 \mu\text{M}$ der aktivste bisher beschriebene mMDH-Inhibitor unter allen untersuchten Paullonen (Abbildung 4-4).

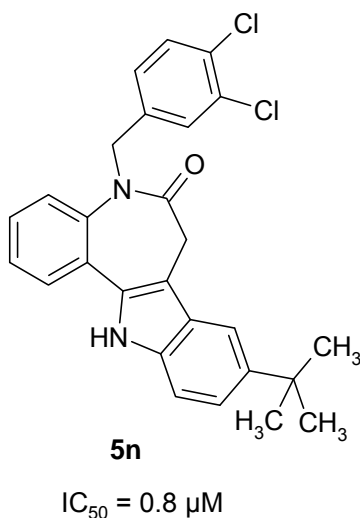


Abbildung 4-4: 9-*tert*-Butyl-5-(3,4-dichlorobenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5n**)

4.1.3 Inhibitorische Aktivität der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisch erschlossene Stoffklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** wurde ebenfalls auf ihre mMDH-inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Ergebnisse von Baker und Bramhill sowie Coats hatten zuvor gezeigt, dass verschiedene Chinolin-3-carbonsäuren die mMDH und auch die Zellatmung von Ehrlich-Aszites-Zellen inhibieren.^{20, 21} Die Chinolin-3-carbonsäure **1d** mit einem IC₅₀-Wert von 0.1 µM war die aktivste Verbindung der von Baker und Bramhill untersuchten Verbindungen (Abbildung 4-5).

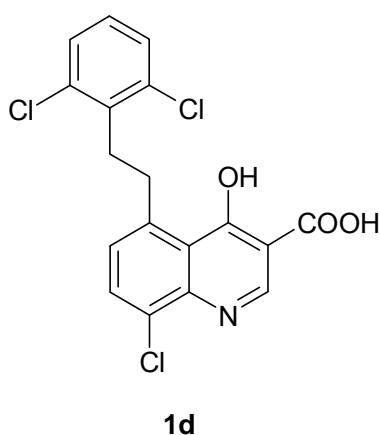
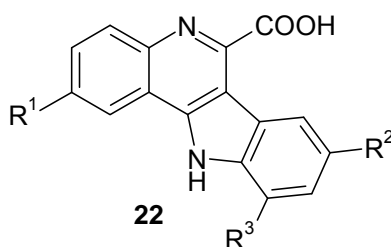


Abbildung 4-5: Aktivste in den Studien von Baker und Bramhill erwähnte mMDH-inhibierende Chinolin-3-carbonsäure **1d**²⁰

Alle erschlossenen 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** wurden in einer Übersichtsmessung bei 10 µM auf ihr inhibitorisches Potential an der mMDH überprüft (Tabelle 4-3). Zeigte das Enzym nach Inkubation mit einer Verbindung eine Restaktivität von ≤ 60%, wurde von dieser Verbindung ein IC₅₀-Wert bestimmt. Die experimentell ermittelten IC₅₀-Werte sind in Tabelle 4-4 aufgeführt.

Tabelle 4-3: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] in Anwesenheit der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]-chinolin-6-carbonsäuren **22** [10 μ M]



22	R¹	R²	R³	Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%]
a	H	Br	H	46.0 \pm 4.5
b	H	Cl	H	33.0 \pm 2.1
c	H	H	H	22.5 \pm 2.4
d	H	C(CH ₃) ₃	H	21.0 \pm 0.6
e	H	CF ₃	H	27.0 \pm 0.7
f	H	CH ₃	H	83.6 \pm 1.3
h	H	NO ₂	H	35.1 \pm 1.3
i	H	COOH	H	89.2 \pm 1.8
j	H	H	Br	43.2 \pm 6.3
k	H	H	Cl	-
l	OCH ₃	C(CH ₃) ₃	H	8.7 \pm 0.4
n	OCH ₃	CF ₃	H	11.7 \pm 0.5
o	OCH ₃	COOH	H	93.5 \pm 1.2
p	I	Cl	H	38.9 \pm 3.8
q	I	F	H	19.5 \pm 0.7
r	I	H	H	5.0 \pm 0.5
s	I	C(CH ₃) ₃	H	*
t	H	C ₉ H ₁₀ NO ₂	H	74.0 \pm 0.3
u	H	C ₆ H ₁₂ NO	H	99.6 \pm 3.3

* Aufgrund der sehr geringen Umsetzungsgeschwindigkeit wurde kein Absolutwert ermittelt.

- Dieser Wert wurde nicht bestimmt.

Die Verbindungen **22i** und **22o**, die in Position 8 des Indolochinolin-Körpers eine Carboxylfunktion tragen, führten nicht zu einer signifikanten Enzymhemmung. Auch die in Position 8 amidierten Chinolincarbonsäuren **22t** und **22u** (Abbildung 4-6), die aus der Arbeit von Pies⁶⁵ stammen, wurden nach der Übersichtsmessung nicht weiter untersucht.

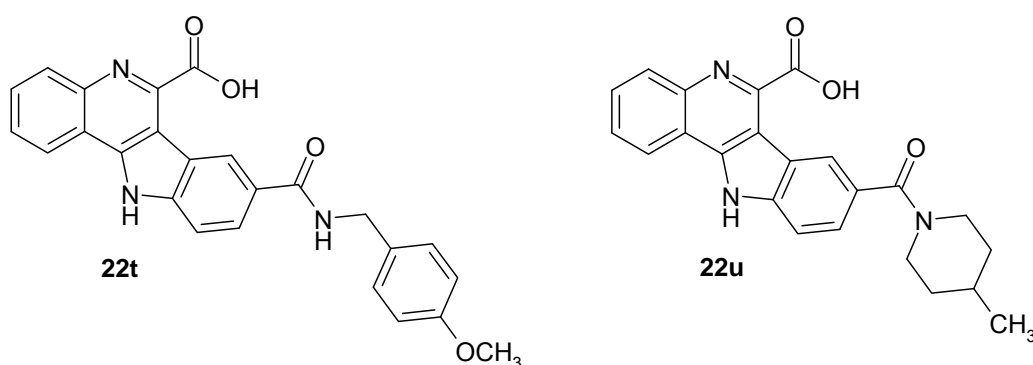


Abbildung 4-6: Strukturen der Chinolin-2-carbonsäuren **22t** und **22u**⁶⁵

Tabelle 4-4: mMDH-inhibitorische Aktivität der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22**, IC₅₀-Werte ± s_M [μM]

22	R¹	R²	R³	IC₅₀-Wert ± s_M [μM]
a	H	Br	H	6.0 ± 0.03
b	H	Cl	H	4.5 ± 0.01
c	H	H	H	5.7 ± 0.02
d	H	C(CH ₃) ₃	H	2.8 ± 0.2
e	H	CF ₃	H	3.8 ± 0.2
h	H	NO ₂	H	4.4 ± 0.3
j	H	H	Br	6.6 ± 0.9
l	OCH ₃	C(CH ₃) ₃	H	3.1 ± 0.01
n	OCH ₃	CF ₃	H	2.9 ± 0.1
p	I	Cl	H	2.0 ± 0.3
q	I	F	H	3.6 ± 0.1
r	I	H	H	2.7 ± 0.04
s	I	C(CH ₃) ₃	H	1.2 ± 0.01

Wie in Tabelle 4-4 zu sehen, liegen die IC_{50} -Werte der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** alle im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 6 μ M. Die pIC_{50} -Werte sind in Abbildung 4-7 dargestellt. Die Verbindungen **22a-j** sind in Position 2 des Indolochinolin-Grundkörpers unsubstituiert (Säulen in Blautönen). Die Einführung einer Methoxygruppe in dieser Position bewirkt eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen **22l** und **22n** (Säulen in gelb/orange). Eine erneute Wirksteigerung wird bei Einführung des voluminösen Iodsubstituenten beobachtet (Säulen in Grüntönen, Verbindungen **22p-s**).

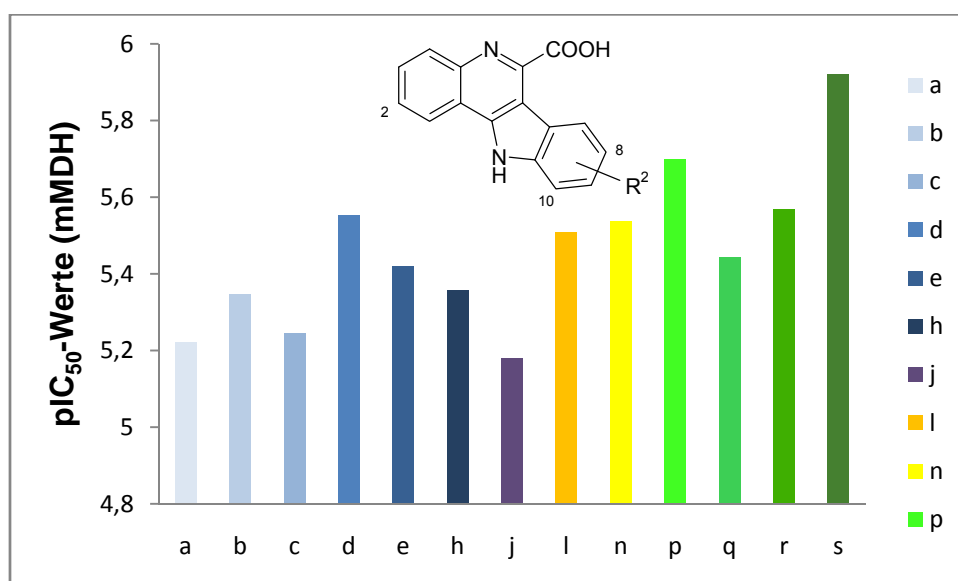


Abbildung 4-7: pIC_{50} -Werte der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** für die Hemmung der mMDH

4.1.4 Inhibitorische Aktivität kommerziell verfügbarer Chinolincarbonsäuren

Da verschiedene Chinolincarbonsäuren, wie die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** und die von Baker und Bramhill beschriebenen Chinolin-3-carbonsäuren **1**, Inhibitoren der Malatdehydrogenase sind, wurden zusätzlich die kommerziell verfügbaren Chinolin-2-carbonsäuren **23-27** (Abbildung 4-8) an der mMDH getestet, um weitere Erkenntnisse über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu gewinnen.

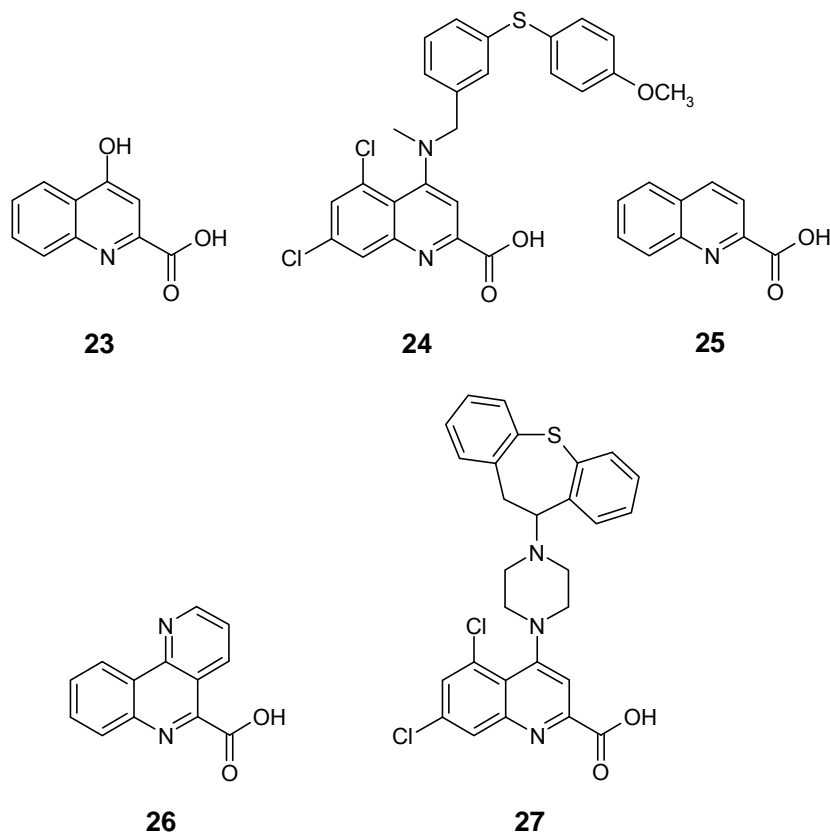


Abbildung 4-8: Strukturen der kommerziell erworbenen Chinolin-3-carbonsäuren **23-27**

Tabelle 4-5: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] in Anwesenheit der Chinolin-2-carbonsäuren **23-27** [10 μ M]

	Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%]
23	99.0 \pm 0.9
24	2.2 \pm 1.4
25	95.1 \pm 3.6
26	98.8 \pm 1.2
27	3.5 \pm 0.1

Die in Position 4 des Chinolinringes mit voluminösen Resten substituierten Verbindungen **24** und **27** zeigten in der Übersichtsmessung ein vielversprechendes enzyminhibitorisches Potential. Die kleineren Moleküle, die Verbindungen **23**, **25** und **26**, hatten bei einer Konzentration von 10 μM keinen inhibitorischen Einfluss auf das Enzym. Von den Verbindungen **24** und **27** wurden IC_{50} -Werte experimentell ermittelt. Die Beobachtungen, dass voluminöse Substituenten das inhibitorische Potential von Chinolincarbonsäuren an der mMDH erheblich steigern, decken sich mit den von Baker und Bramhill veröffentlichten Ergebnissen.^{11, 17, 18} Mit IC_{50} -Werten von 2.3 bzw. 0.6 μM zeigten diese Verbindungen eine ähnliche Aktivität wie die 11*H*-Indolo[3,2-*c*]-chinolin-6-carbonsäuren **22**.

Tabelle 4-6: mMDH-inhibitorische Aktivität der Chinolincarbonsäuren **24** und **27**, IC_{50} -Werte $\pm s_M$ [μM]

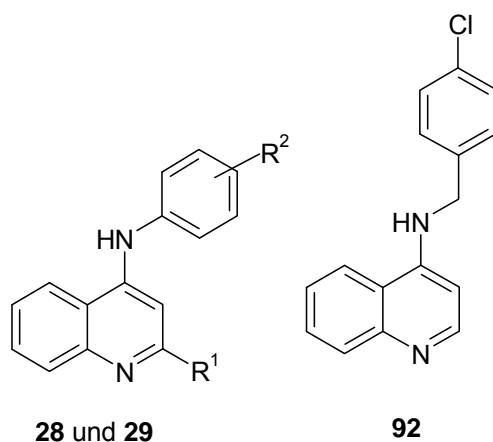
	$\text{IC}_{50}\text{-Wert} \pm s_M$ [μM]
24	2.3 \pm 0.2
27	0.6 \pm 0.01

4.1.5 Inhibitorische Aktivität der Anilinochinolinderivate

Das Strukturelement 4-Anilinochinolin ist in vielen ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren enthalten.^{121, 141, 142} Auch auf dem Markt befindliche Kinaseinhibitoren wie z. B. Gefitinib (Iressa®) enthalten das sehr ähnliche 4-Aminochinazolin als charakteristisches Strukturelement.¹⁴³ Im Rahmen dieser Arbeit wurden einfach substituierte 4-Anilinochinoline **28** und deren analoge Chinolin-2-carbonsäuren **29** synthetisiert und auf ihr Potential, auch NAD^+ -abhängige Dehydrogenasen wie die mMDH zu inhibieren, untersucht (Tabelle 4-7). Die Frage, ob die Carboxylfunktion in Chinolin-2-carbonsäuren für eine inhibitorische Wirkung essentiell ist, sollte ebenfalls untersucht werden.

In der Übersichtstestung zeigte keines der Anilinochinolinderivate eine signifikante inhibitorische Aktivität. Die mMDH wurde sehr schwach von dem 3,5-dichlor-substituierten Derivat **28e** inhibiert. Eine zusätzliche Übersichtsmessung bei einer Konzentration von 25 μM zeigte eine Hemmung der mMDH von ca. 50%. Die Chinolin-2-carbonsäuren **29** zeigten ebenfalls keine inhibitorische Aktivität. Ob die Carboxylfunktion für eine Wirkung essentiell ist, konnte somit aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] in Anwesenheit der Anilinochinoline **28**, **29** und **92** [10 μM]

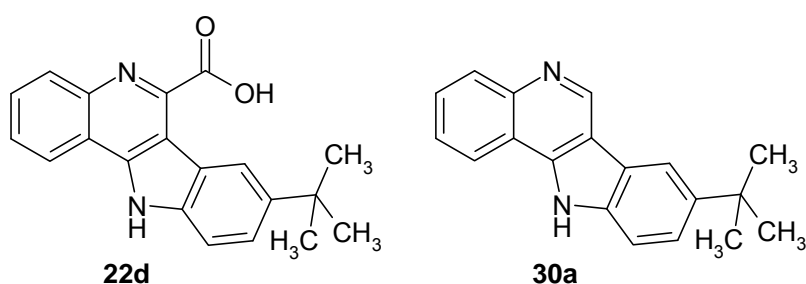


	R¹	R²	Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%]
28a	H	4'-Br	95.3 \pm 0.5
28b	H	4'-Cl	98.9 \pm 0.1
28c	H	4'-OCH ₃	97.7 \pm 0.3
28d	H	4'-I	97.0 \pm 0.2
28e	H	3',5'-di-Cl	88.2 \pm 0.1
28f	CH ₃	4'-Br	96.8 \pm 1.4
28g	CH ₃	4'-Cl	96.5 \pm 0.2
28h	CH ₃	3',5'-di-Cl	96.2 \pm 0.2
29a	COOH	4'-Br	97.5 \pm 0.0
29b	COOH	4'-Cl	98.8 \pm 0.9
92			95.7 \pm 0.1

Für eine Optimierung der Strukturen **28**, **29** und **92** bietet sich eine Substitution mit voluminöseren Resten in Position 4 an, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Um den Einfluss der Carboxylfunktion auf die mMDH-Inhibition durch 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** zu untersuchen, wurde der IC₅₀-Wert des 8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolins (**30a**) ermittelt und mit dem der analogen Carbonsäure **22d** verglichen (Tabelle 4-8).

Tabelle 4-8: mMDH-inhibitorische Aktivität der 8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22d**) und des 8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolins (**30a**), IC₅₀-Werte $\pm s_M$ [μ M] im Vergleich



IC ₅₀ -Wert $\pm s_M$ [μ M]	
22d	2.8 \pm 0.2
30a	12.9 \pm 0.3

Die Verbindung **30a**, die keine Carboxylfunktion mehr trägt, ist deutlich schwächer aktiv als die analoge 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure **22d**. Der Indolochinolin-Grundkörper allein zeigt zwar eine mäßige inhibitorische Aktivität, diese wird allerdings durch das Vorhandensein der Carboxylfunktion in Position 2 erheblich gesteigert.

4.1.6 Untersuchungen zur Reaktionskinetik

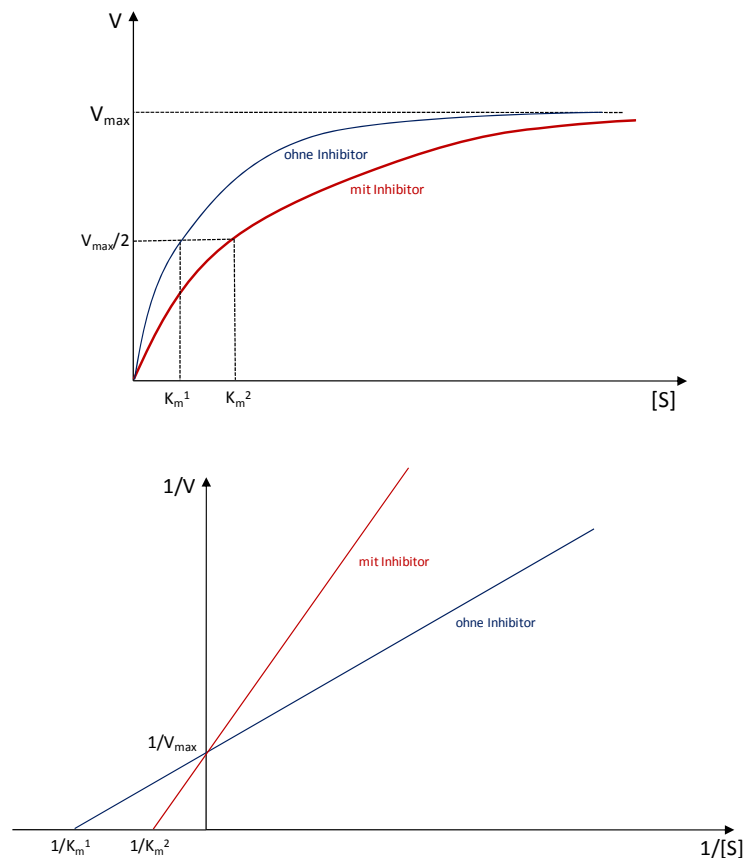
Erste Untersuchungen von Knockaert und Kohfeld deuten auf einen NAD⁺-kompetitiven Hemmmechanismus der Paullone **3** an der Malatdehydrogenase hin.^{31, 33} Für den im Rahmen dieser Arbeit erschlossenen aktivsten Vertreter der am Lactam-Stickstoff benzylierten Paullone **5**, die Verbindung **5n**, sollten Messungen zur Reaktionskinetik durchgeführt werden. 9-*tert*-Butyl-5-(3,4-dichlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5n**) hemmt die mitochondriale Malatdehydrogenase im niedrig-mikromolaren Bereich mit einem IC₅₀-Wert von 0.8 µM. Um sicherzustellen, dass dieser IC₅₀-Wert nicht durch unspezifische Hemmmechanismen verursacht wurde, wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms mMDH bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und NAD⁺-Konzentrationen bestimmt. Mit Hilfe von Kinetikmessungen kann man Aussagen über den Mechanismus der Inhibition machen. Die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4-5 und Abbildung 4-9) beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit *v* als Funktion der Substratkonzentration [S]. Mit steigender Substratkonzentration nähert sich die Reaktionsgeschwindigkeit *v* der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit *v*_{max}. *K*_m ist die Michaelis-Konstante, die diejenige Substratkonzentration angibt, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit (*V*_{max}/2) erreicht wird.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Gleichung 4-5: Michaelis-Menten-Gleichung

Die kompetitive Hemmung stellt die häufigste Form der Enzymhemmung dar. Bei ihr konkurriert der Inhibitor mit dem natürlichen Substrat bzw. Cosubstrat um dieselbe Bindestelle am Enzym. Häufig ähneln die Inhibitoren deshalb den natürlichen Substraten und besitzen ähnliche Bindeeigenschaften. Die katalytische Aktivität wird in Anwesenheit des Inhibitors herabgesetzt. Bei einer erhöhten Konzentration des natürlichen Substrates bzw. Cosubstrates kann der Inhibitor von der Bindestelle verdrängt werden, und volle Enzymaktivität wird erreicht. Durch die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Substrat- bzw. Cosubstratkonzentration und in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen eines kompetitiven Inhibitors

werden charakteristische Michaelis-Menten-Diagramme erhalten. Die Anwesenheit des Inhibitors führt zu einer flacheren Hyperbel und dadurch zu einem erhöhten K_m -Wert. Bei genügend hoher Substratkonzentration $[S]$ wird v_{\max} trotzdem erreicht (Abbildung 4-9). Die doppelt reziproke Darstellung des Michaelis-Menten-Diagramms führt zu einem Lineweaver-Burk-Diagramm. Auf der y-Achse wird hier $1/v$ gegen $1/[S]$ aufgetragen. Bei Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors ergibt sich auch im Lineweaver-Burk-Diagramm ein charakteristisches Linienschema. Die Geraden folgen alle der in Abbildung 4-9 angegebenen Geradengleichung. Alle Geraden, die von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bzw. der reinen Enzymaktivität stammen, haben einen gemeinsamen Schnittpunkt mit der y-Achse, an dem $1/v_{\max}$ abzulesen ist (Abbildung 4-9).



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Abbildung 4-9: Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramm in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors⁵

Für die aktive Verbindung **5n** wurden die beschriebenen Diagramme experimentell ermittelt. Dafür wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit der mMDH bei verschiedenen NAD^+ -Konzentrationen und verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors **5n** gemessen. Die NAD^+ -Konzentrationen wurden im Bereich zwischen 5 und 150 μM etwas höher als bei Kohfeld³³ und Lin¹⁴⁴ gewählt. Messpunkte bei höheren NAD^+ -Konzentrationen bewirken mehr Punkte nahe des Schnittpunktes $1/v_{\max}$ im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 4-10). Aus den Messwerten wurden die dargestellten Diagramme erstellt.

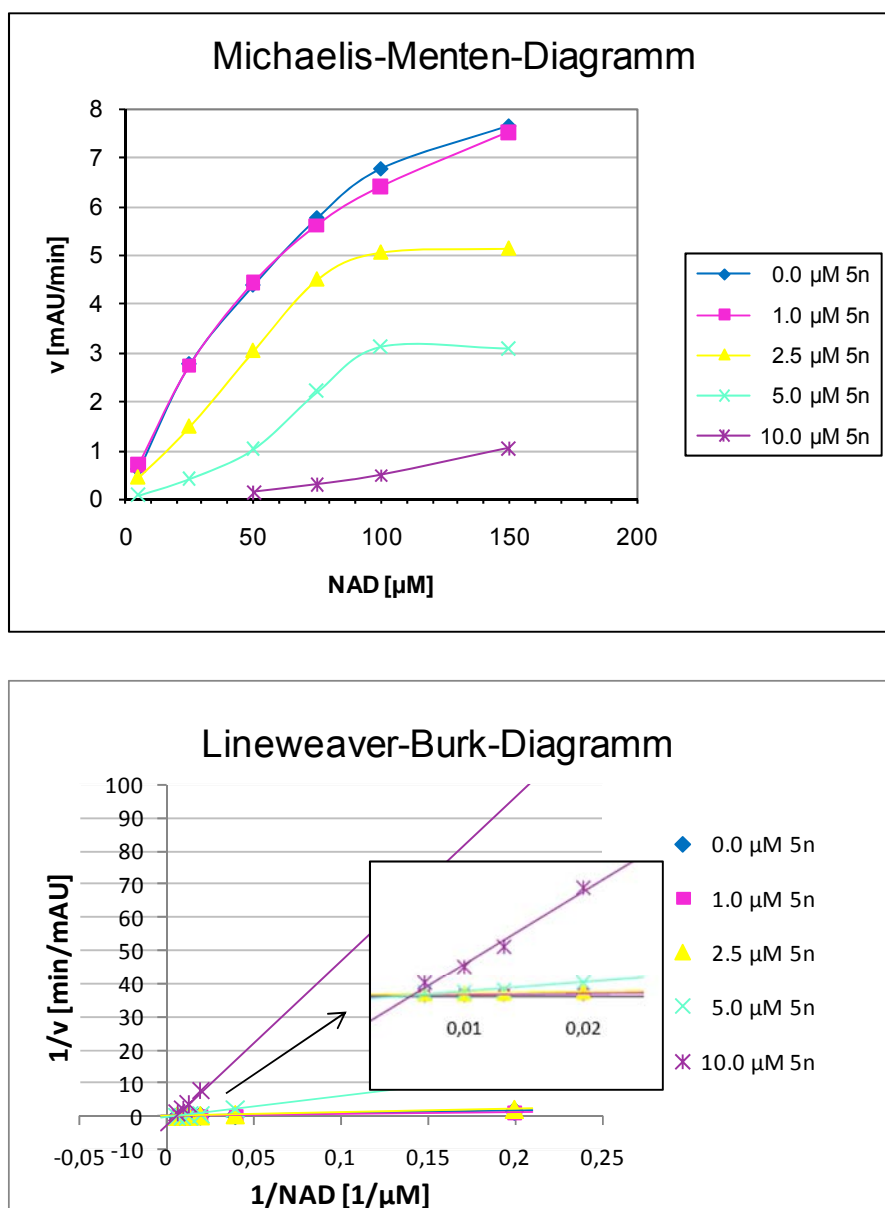


Abbildung 4-10: Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramm der Verbindung **5n**

Das Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 4-10) zeigt die charakteristische Linienstruktur eines kompetitiven Inhibitors.¹³⁸ Die Geraden mit den verschiedenen Steigungen schneiden sich in einem Punkt sehr nahe der y-Achse. In der Theorie gibt es einen direkten Schnittpunkt mit der y-Achse (Abbildung 4-9). Die Abweichung lässt sich mit Schwankungen in biologischen Messsystemen im Allgemeinen erklären. Die gelbe und die grüne Kurve zeigen im Bereich zwischen den NAD⁺-Konzentrationen 100 und 150 µM eine Abflachung, die nicht typisch für einen kompetitiven Enzyminhibitor ist. Es wird vermutet, dass bei diesen hohen NAD⁺-Konzentrationen andere Wechselwirkungen mit dem Enzym die Messungen stören. Das Lineweaver-Burk-Diagramm unterstreicht jedoch, dass **5n** ein NAD⁺-kompetitiver Inhibitor der mitochondrialen Malatdehydrogenase ist. Bei den entsprechenden Diagrammen nicht-kompetitiver Inhibitoren schneiden die Geraden die y-Achse an deutlich verschiedenen Punkten (verschiedene $1/v_{\max}$ Werte) und haben einen gemeinsamen Schnittpunkt im negativen Bereich der x-Achse, an dem $-1/K_m$ abzulesen ist.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen verdeutlichen, dass es sich bei der inhibitorischen Wirkung von **5n** um eine spezifische Aktivität gegenüber der mMDH handelt. In mehreren Veröffentlichungen berichten McGovern und Shoichet¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ über Substanzen, die einige Beispielenzyme, unter anderem auch die Malatdehydrogenase, über unspezifische Mechanismen promiskuitiv inhibieren. Einige Substanzen, unter ihnen auch bekannte Enzyminhibitoren, können bei Konzentrationen zwischen 10-400 µM Aggregate bilden, die Enzyme adsorbieren und dadurch eine Inhibition dieser Enzyme bewirken. Da diese Adsorptionsvorgänge nur über elektrostatische und sterische Wechselwirkungen zustande kommen, werden diverse Enzyme unselektiv, also promiskuitiv, gehemmt. Neben der Malatdehydrogenase wurden durch solche promiskuitiven Hemmstoffe z. B. auch Chymotrypsin und β -Lactamase inhibiert. Durch Zugabe von geeigneten Detergenzien (z. B. Triton X-100, Tween-20) kann die Aggregatbildung und folglich auch die unspezifische Inhibition unterdrückt werden.¹⁴⁹ Die gebildeten Aggregatpartikel, die eine Größe von 30-1000 nm haben, können auch mittels Lichtstreuung (DLS = *dynamic light scattering*) identifiziert werden. Diese Verfahren dienen dazu, die falschen positiven Ergebnisse, die durch unspezifische Inhibition verursacht werden, von spezifischen Wirkungen trennen zu können. Welche physikochemischen Eigenschaften von Substanzen für eine Aggregatbildung verantwortlich sind, ist noch nicht

vollständig geklärt.¹⁴⁵ Grundsätzlich scheinen allerdings schlecht-lösliche Substanzen mit einem hohen clogP-Wert anfällig für eine Aggregatbildung zu sein.

Auch die Interpretation der Dosis-Wirkungs-Kurven kann helfen, Inhibitoren dieser Art zu identifizieren.¹⁵⁰ Promiskuitive, aggregatbildende Inhibitoren zeigen sehr steile Dosis-Wirkungsbeziehungen. Inhibitoren, deren Effekt auf einer spezifischen Wechselwirkung mit einem bestimmten Enzym beruht, zeigen Dosis-Wirkungs-Kurven mit einem sigmoiden Verlauf. An diesen Kurven ist deutlich zu erkennen, dass eine gesteigerte Zugabe des Inhibitors auch zu gesteigerten Inhibitionseffekten führt. In Abbildung 4-11 ist die Dosis-Wirkungs-Kurve der Verbindung **5n** dargestellt. Der sigmoide Kurvenverlauf ist deutlich zu erkennen und unterstützt damit die Vermutung, dass **5n** spezifisch mit der mMDH wechselwirkt.

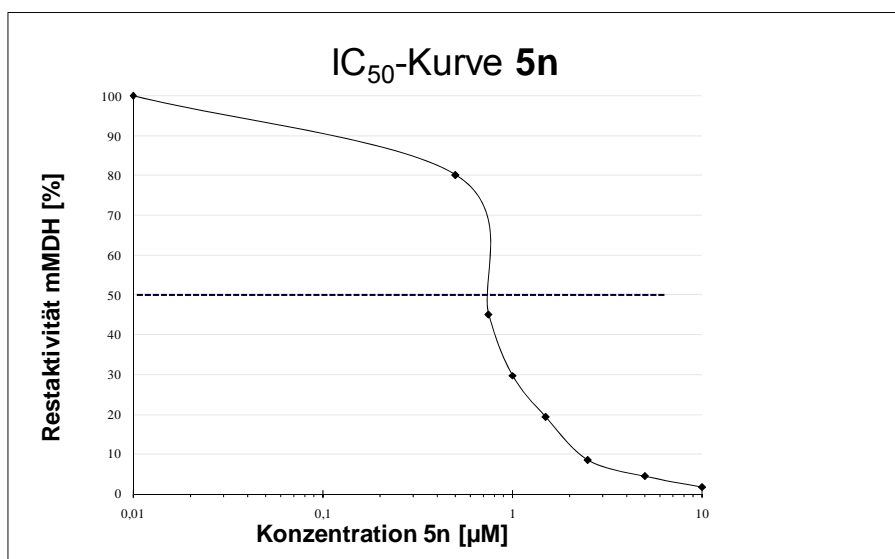


Abbildung 4-11: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Verbindung **5n** an der mMDH

4.2 Inhibitorische Aktivität gegenüber Sirtuinen

Sirtuine sind NAD^+ -abhängige Histon- bzw. Proteindesacetylasen. Durch die Abspaltung des Acetylrestes von acetylierten Lysinresten der Histone und von Proteinen, wie z. B. p53 oder α -Tubulin, ändern sich die Konformation und die Aktivität der Proteine. Inhibitoren dieser Enzyme greifen in den Acetylierungsgrad der jeweiligen Substrate ein und können dadurch komplexe biologische Funktionen regulieren. Histondesacetylasen der Klassen I und II sind Zn^{2+} -abhängige Amido-hydrolasen und bewirken über einen anderen Mechanismus die Desacetylierung verschiedener Histone und Proteine. Diese Enzymklasse wurde bereits intensiv erforscht. Ihre Inhibitoren stellen eine neue Klasse interessanter potentieller Antitumorwirkstoffe dar. So wurde der Histondesacetylaseinhibitor Vorinostat, Zolinza®, im Oktober 2006 von der FDA in Amerika als Drittlinientherapie zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen (Kapitel 1.3.1). Die Biologie der Sirtuine ist noch nicht vollständig aufgeklärt; erste Untersuchungen zeigen allerdings auch hier einen potentiellen Angriffspunkt für die Therapie von Tumoren. So führt die Zugabe von Cambinol (**15b**) (Kapitel 1.3.3), eines Inhibitors von SIRT1 und SIRT2, in Burkitt-Lymphom-Zellen zu einer Hyperacetylierung des Tumorsuppressorproteins p53 und des Onkoproteins BCL6 und zu darauffolgender Apoptose.⁵⁷

Die Identifizierung selektiver Inhibitoren der Sirtuine könnte die komplexen biologischen Funktionen dieser Enzymklasse weiter aufklären und zu therapeutisch interessanten Wirkstoffen führen.

Viele Kinaseinhibitoren besetzen die Bindetasche des ATP. NAD^+ und ATP besitzen als gemeinsames Strukturelement die Adeninbase bzw. das Adenosin. Kinaseinhibitoren, die Adenosinmimetika darstellen, könnten daher auch NAD^+ -abhängige Enzyme inhibieren. Die Arbeitsgruppe um Manfred Jung in Freiburg beschäftigte sich mit der systematischen Untersuchung einer Bibliothek solcher Verbindungen und identifizierte neue Leitstrukturen für Sirtuininhibitoren. Das 5-Benzyl-9-brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5a**) zeigte eine inhibitorische Aktivität gegenüber den humanen Sirtuinen SIRT1 und SIRT2 bei gleichzeitigem Verlust der starken kinaseinhibitorischen Aktivität im Vergleich mit dem nicht-benzylierten Kenpaullon (**3a**).^{30, 53} Der IC_{50} -Wert der Verbindung **5a** wurde an einem fluori-

metrischen Testsystem bestimmt und lag für SIRT2 bei 42.8 μM . Die Überprüfung der inhibitorischen Aktivität an einem zweiten Testsystem, welches mit radioaktiv markierten Substraten arbeitet, führte zu IC_{50} -Werten der Verbindung **5a** von 8 μM an SIRT1 und 10 μM an SIRT2.⁵³ Die Schwankung dieser Werte kann mit den verschiedenen verwendeten Bedingungen der Testsysteme erklärt werden. Insgesamt kann festgestellt werden, dass **5a** ein aktiver Inhibitor von humanen Sirtuinen ist. Um zu untersuchen, ob **5a** auch *in vivo* eine inhibitorische Wirkung an SIRT2 zeigt, wurde die Hyperacetylierung des SIRT2-Substrates α -Tubulin in einer Zellkultur aus A549 Lungenkrebszellen untersucht.⁵¹ Die Ergebnisse zeigten, dass die Verbindung **5a** die Hyperacetylierung von α -Tubulin *in vivo* induziert. Das beweist, dass **5a** ein potenter Inhibitor von SIRT2 *in vitro* und *in vivo* ist.

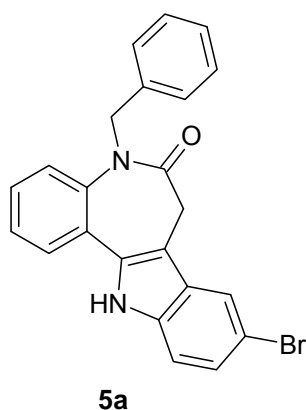


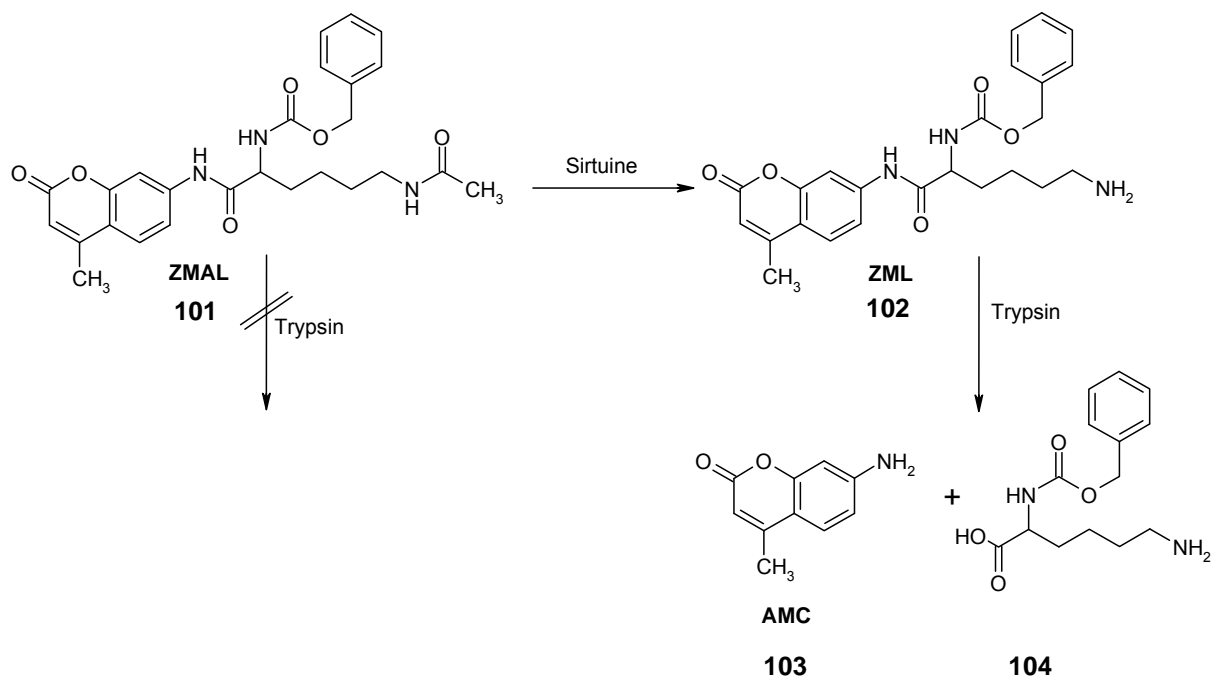
Abbildung 4-12: Struktur von 5-Benzyl-9-brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5a**)

Aufgrund der Ergebnisse mit **5a** wurden die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten am Lactam-Stickstoff benzylierten Paullone **5** bei Kooperationspartnern (Arbeitsgruppe Jung, Freiburg) auf Inhibition humaner Sirtuine getestet. Da die Stoffklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** sehr gute inhibitorische Aktivität an der NAD^+ -abhängigen mMDH zeigte (Kapitel 4.1.3), wurden auch Derivate dieser Stoffklasse an humanen NAD^+ -abhängigen Sirtuinen getestet.

Zunächst wurden Übersichtsmessungen aller Verbindungen bei Konzentrationen von 100 und 50 μM durchgeführt. Von vielversprechenden Derivaten **5** und **22** wurden IC_{50} -Werte ermittelt (Tabellen 4-9 und 4-10). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen erfolgte mit einem homogenen Fluoreszenz-Assay, der im Folgenden erläutert wird.^{35, 151, 152}

Homogener Fluoreszenz-Assay zur Bestimmung der sirtuininhibitorischen Aktivität

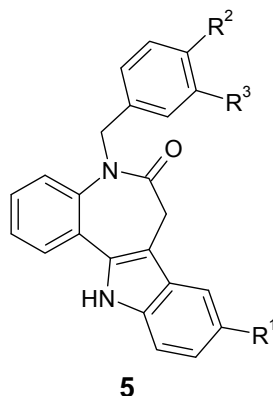
Der verwendete Assay ist ein doppelt enzymatisches Testverfahren, bei dem zwei enzymatische Reaktionen hintereinander geschaltet sind. Als Substrat für den Assay wurde ZMAL (**101**, ein Methylaminocumarinacetyllysinderivat) verwendet. Dieses Substrat wird von Sirtuinen und auch von Histondesacetylasen der Klassen I und II umgesetzt und desacetyliert. Nach Abspaltung des Acetylrestes entsteht der Metabolit ZML (**102**), der nun eine freie Aminogruppe trägt. In einem zweiten Reaktionsschritt wird die Endopeptidase Trypsin zugesetzt. Durch Spaltung des Metaboliten ZML am C-Terminus des Lysins durch Trypsin entstehen ein *N*-geschütztes Lysin **104** und ein Aminocumarin **103**, welches andere Fluoreszenzeigenschaften als das ursprüngliche Substrat ZMAL (**101**) besitzt. Entscheidend ist die Tatsache, dass Trypsin selektiv den desacetylierten Metaboliten ZML spaltet und dass das ursprüngliche Substrat ZMAL von dieser Endopeptidase nicht angegriffen wird. Die Spaltung durch Trypsin kann also erst nach der Desacetylierung von ZMAL zu ZML durch Sirtuine oder andere Histondesacetylasen erfolgen. Der Zusatz von Inhibitoren der Sirtuine führt zu einer verringerten Bildung des desacetylierten Metaboliten ZML und folglich zu einer abgeschwächten Konzentration des freien Aminocumarins (AMC) **103** (Schema 4-2).



Schema 4-2: Reaktionsschema des Testsystems für die inhibitorische Aktivität an Sirtuinen³⁵

4.2.1 Inhibitorische Aktivität der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benz-azepin-6(5*H*)-one

Tabelle 4-9: Inhibitorische Aktivität der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benz-azepin-6(5*H*)-one **5** an humanem Sirtuin SIRT2



5	R¹	R²	R³	Hemmung [%] bei 100 µM Inhibitor	Hemmung [%] bei 50 µM Inhibitor	IC₅₀-Wert ± SE
a	Br	H	H	k.D.	k.D.	42.8 ± 17.9
b	Cl	H	H	46.5	33.8	-
c	H	H	H	58.0	44.4	-
d	C(CH ₃) ₃	H	H	35.7	k.H.	-
e	CF ₃	H	H	56.9	51.9	-
f	CH ₃	H	H	23.0	13.3	-
g	OCH ₃	H	H	68.7	22.1	>100
h	Br	CH ₃	H	39.8	32.8	-
i	Br	OCH ₃	H	49.4	52.9	-
j	Br	Cl	H	70.4	43.5	84.6 ± 17.9
k	Br	Cl	Cl	81.7	66.9	33.8 ± 6.3
l	H	CH ₃	H	27.2	k.H.	-
m	H	Cl	Cl	47.4	40.2	-
n	C(CH ₃) ₃	Cl	Cl	50.2	17.6	-

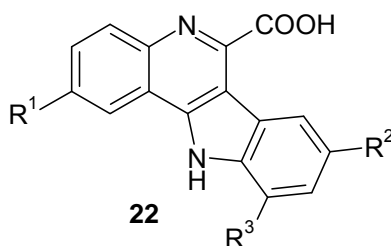
k.D. zu dieser Verbindung liegen für die Übersichtsmessung keine Daten vor
k.H. bei dieser Konzentration wurde keine Hemmung festgestellt
- diese IC₅₀-Werte wurden nicht bestimmt

Alle Vertreter der Stoffklasse **5** zeigen inhibitorische Aktivität gegenüber der humanen Histondesacetylase SIRT2. Bei einer Konzentration von 100 µM bewirken vor allem die Verbindungen **5j** und **5k** eine starke Inhibition des Enzyms (70 und 82%). Mit einem IC₅₀-Wert von 33.8 µM ist 9-Brom-5-(3,4-dichlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5k**) die aktivste Verbindung dieser Stoffklasse. Keine der Verbindungen **5** inhibiert das humane Sirtuin SIRT1 bei 100 µM.

4.2.2 Inhibitorische Aktivität der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren

Von den meisten Verbindungen **22** wurden nach den vielversprechenden Übersichtstestungen bei 100 und 50 µM auch IC₅₀-Werte gemessen (Tabelle 4-10).

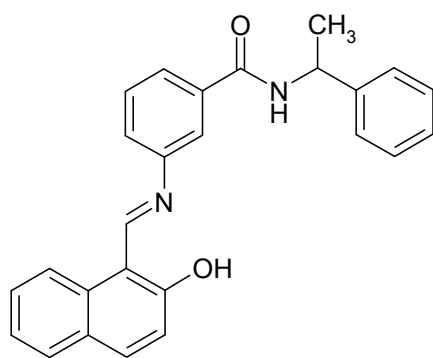
Tabelle 4-10: Inhibitorische Aktivität einiger 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** an humanem Sirtuin SIRT2



22	R¹	R²	R³	Hemmung [%] bei 100 µM Inhibitor	Hemmung [%] bei 50 µM Inhibitor	IC₅₀-Wert ± SE
c	H	H	H	115.2	67.3	97.2 ± 9.4
d	H	C(CH ₃) ₃	H	k.D.	k.D.	30.9 ± 5.0
e	H	CF ₃	H	81.8	59.9	47.6 ± 4.5
f	H	CH ₃	H	116.5	81.5	93.8 ± 8.7
h	H	NO ₂	H	101.4	97.7	36.8 ± 2.2
i	H	COOH	H	50.7	46.1	-
j	H	H	Br	89.8	69.8	51.1 ± 5.8
k	H	H	Cl	70.6	57.3	42.4 ± 7.0
p	I	Cl	H	75.3	70.8	61.1 ± 5.4

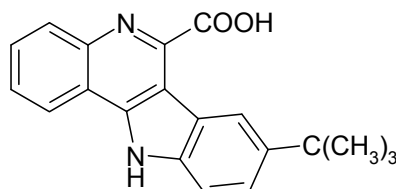
k.D. zu dieser Verbindung liegen für die Übersichtsmessung keine Daten vor
- diese IC₅₀-Werte wurden nicht bestimmt

Alle getesteten Verbindungen dieser Stoffklasse hemmen SIRT2 bei Konzentrationen von 100 und 50 μM stark. Die beiden aktivsten Vertreter **22d** und **22h** zeigen IC_{50} -Werte von 31 und 37 μM . Diese Werte im mittleren mikromolaren Bereich erscheinen zwar verglichen mit Inhibitoren anderer Enzyme hoch, müssen jedoch in Relation zu den bisher publizierten Werten anderer SIRT2-Hemmstoffe betrachtet werden. Dazu gehört Sirtinol (**15a**, IC_{50} (SIRT2) = 38 μM), ein bereits umfangreich untersuchter Inhibitor humaner Sirtuine.⁵⁴⁻⁵⁶



15a

IC_{50} (SIRT2) = 38 μM



22d

IC_{50} (SIRT2) = 31 μM

Abbildung 4-13: Vergleich der IC_{50} -Werte von Sirtinol (**15a**) und 8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22d**)

4.3 Proteinkinase-inhibitorische Aktivität

Einige der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden zur Überprüfung ihrer Selektivität an sechs verschiedenen ATP-abhängigen Proteinkinasen getestet. Die Testungen wurden in den Laboratorien von Laurent Meijer (Station Biologique, Roscoff, Frankreich) durchgeführt.

Proteinkinasen sind Enzyme, die γ -Phosphatgruppen von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) auf Substratproteine übertragen und dadurch eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionsprozessen spielen. Die meisten synthetisch hergestellten Kinaseinhibitoren sind ATP-kompetitiv.¹⁵³ Paullone **3** zeigen inhibitorische Aktivität gegenüber Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs), die an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind. Kenpaullon (**3a**) ist ein potenter Inhibitor von CDK1/Cyclin B ($IC_{50} = 0.4 \mu M$), CDK2/Cyclin A ($IC_{50} = 0.68 \mu M$) und CDK5/p25 ($IC_{50} = 0.85 \mu M$). Die Benzylierung von Kenpaullon (**3a**) führt zu einer signifikanten Reduktion des kinaseinhibitorischen Potentials der Verbindung. Das 5-Benzyl-9-brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5a**) zeigt an dem CDK1/Cyclin B-Komplex nur noch einen IC_{50} -Wert von $35 \mu M$.³⁰ Auch die neu synthetisierten Verbindungen der Stoffklasse der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **5** zeigen keine starke inhibitorische Aktivität gegenüber den getesteten Kinasen (CDK1, CDK5, GSK-3, CK1, CDK2A und Erk2). Alle IC_{50} -Werte lagen über $10 \mu M$ und wurden nicht näher bestimmt. 9-Brom-5-(4-chlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5j**) zeigte inhibitorische Aktivität an der Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) mit einem IC_{50} -Wert von $1.1 \mu M$. Da die getestete Probe noch ca. 3% des Eduktes Kenpaullon (**3a**) enthielt, könnte die beobachtete kinaseinhibitorische Wirkung von dieser geringen Menge des potenten GSK-3-Inhibitors Kenpaullon (**3a**) verursacht worden sein.

Auch vier der getesteten 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** zeigen inhibitorische Aktivität gegenüber der GSK-3 im niedrig mikromolaren Bereich. Die 10-brom- und 10-chlorsubstituierten Verbindungen **22j** und **22k** haben IC_{50} -Werte von 0.28 und $0.42 \mu M$. Die Verbindungen **22h** und **22i**, die in Position 8 eine Nitro- bzw. eine Carboxylgruppe tragen, inhibieren die GSK-3 mit IC_{50} -Werten von 0.82 und $0.35 \mu M$. Weitere Kinasen werden von der Stoffklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** nicht gehemmt ($IC_{50} > 10 \mu M$).

Abgesehen von den genannten Ausnahmen kann abschließend festgestellt werden, dass am Lactam-Stickstoff benzylierte Paullone **5** und 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** eine Selektivität für die NAD⁺-abhängige mitochondriale Malatdehydrogenase (mMDH) gegenüber den untersuchten Proteinkinasen besitzen.

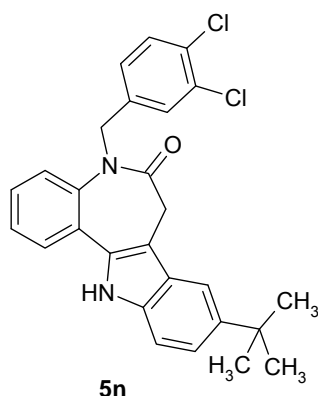
4.4 In vitro Antitumoraktivität

Einige der synthetisierten Verbindungen wurden beim amerikanischen National Cancer Institut (NCI) an 60 verschiedenen humanen Krebszelllinien, die nach organspezifischen Erkrankungen in Untergruppen eingeteilt sind, auf ihre antiproliferative Aktivität getestet. Die verschiedenen Tumorzelllinien stammen aus nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Leukämie, Nierenkarzinom, Melanom, Prostatakarzinom und ZNS-Tumoren. Von den Verbindungen wird zunächst bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M ein Inhibitionsprofil (*one dose mean graph*) experimentell ermittelt. Dazu werden die Testverbindungen jeweils mit den 60 Zelllinien inkubiert, und das Wachstum der Zelllinien wird gegenüber einer nicht behandelten Referenz beobachtet und in Prozent der Referenz angegeben. Ein Wachstum kleiner 100% bedeutet, dass die Verbindung eine wachstumsinhibierende Wirkung auf die jeweilige Zelllinie ausgeübt hat. Werte größer 100% bedeuten, dass eine Wachstumsinduktion stattgefunden hat. In dem Inhibitionsprofil (*one dose mean graph*) wird der Mittelwert aus den Wachstumsergebnissen aller Zelllinien als senkrechte Bezugslinie in dem Balkendiagramm (Abbildung 4-14) dargestellt. Balken, die von dieser Bezugslinie nach rechts zeigen, weisen auf eine stärkere Wachstumsinhibition gegenüber diesem Mittelwert hin. Zeigen die Balken dagegen nach links, wurde die betreffende Zelllinie in ihrem Wachstum weniger inhibiert oder sogar zum Wachstum angeregt.

Drei Derivate der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** wurden vom NCI auf ihre *in vitro* Antitumoraktivität überprüft. Die Verbindungen **22d** und **22e**, die einen 8-Tertiärbutylsubstituenten bzw. eine 8-Trifluormethylgruppe tragen, bewirkten bei den Tumorzelllinien keine nennenswerte Wachstumshemmung. Das mittlere Wachstum lag bei 92 und 85%. 10-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22j**) konnte das Wachstum einiger Zelllinien deutlich inhibieren. So wurde die Zelllinie

A549, eine Lungentumorzelllinie, in ihrem Wachstum um 80% gehemmt. Auch einige Leukämiezelllinien, wie die K-562 und die RPMI-8226, zeigten nach Inkubation mit **22j** nur noch 40% des ursprünglichen Wachstums. Die mittlere Wachstumsinhibition dieser Verbindung lag allerdings auch nur bei 22%.

Von der Stoffklasse der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **5** inhibierten die Derivate **5d** und **5j** das Wachstum der Tumorzelllinien nicht signifikant. Das Derivat **5n** konnte das mittlere Wachstum allerdings um 35% senken. Verschiedene Leukämiezelllinien waren besonders sensibel gegenüber dieser Verbindung. In Kapitel 4.1.2 wurde beschrieben, dass diese Verbindung der aktivste Inhibitor der mMDH im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist. Inwieweit die inhibitorische Aktivität der Verbindung gegenüber diesem Enzym des Energiestoffwechsels mit der *in vitro* Antitumoraktivität korreliert, ist nicht geklärt. In Abbildung 4-14 ist der *one dose meangraph* von **5n** dargestellt. Die Daten aller getesteten Verbindungen sind in Tabelle 7-4 aufgeführt.



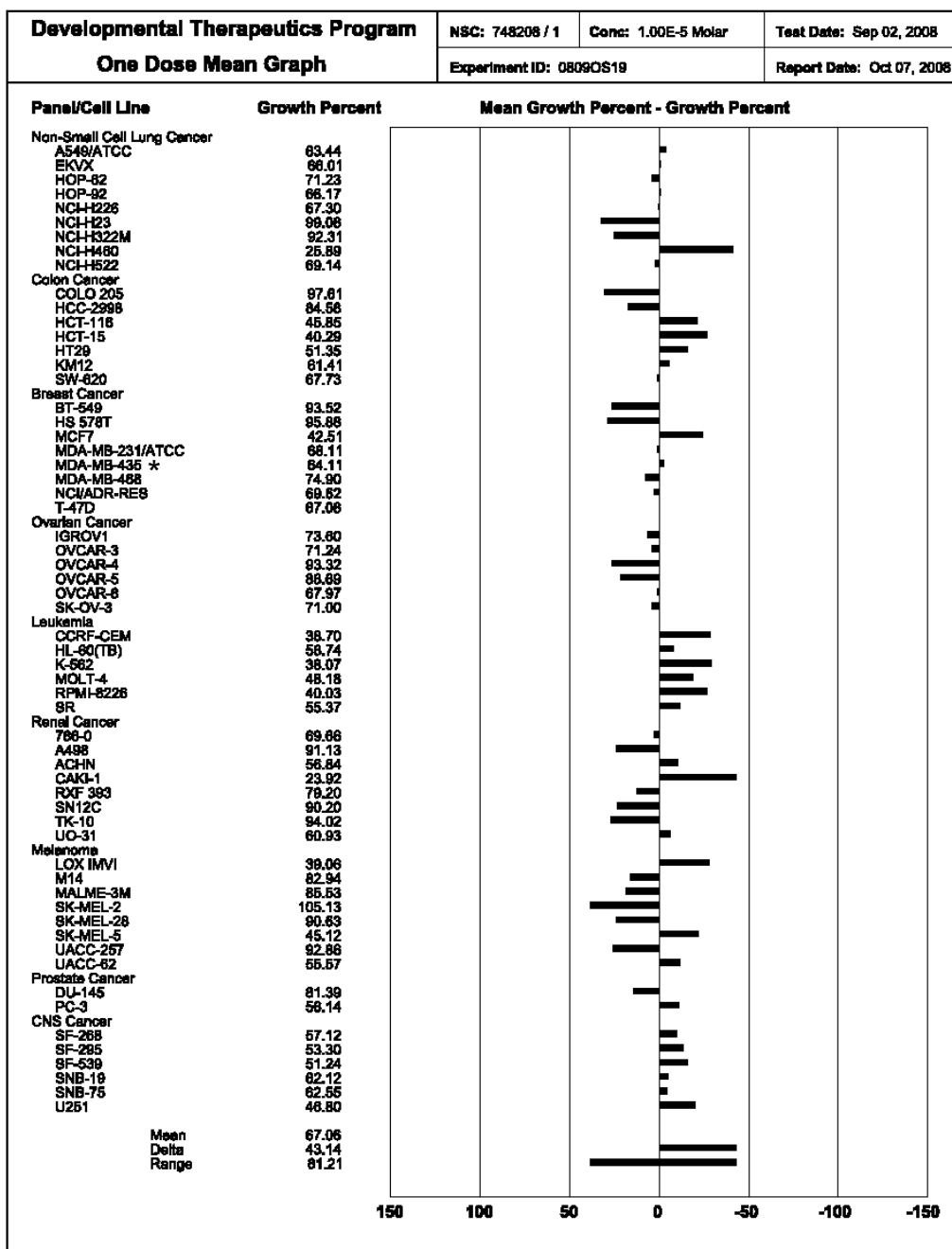


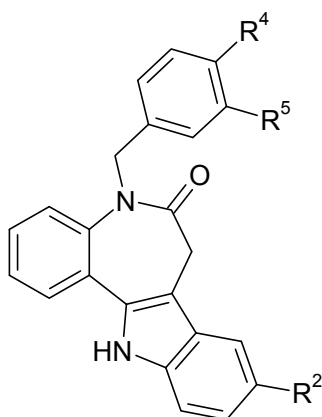
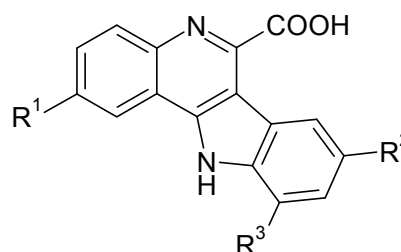
Abbildung 4-14: Inhibitionsprofil (*one dose meangraph*) der Verbindung **5n** an 60 humanen Tumorzelllinien

* Die Zelllinie MDA-MB-435, die in diesem Diagramm als Brustkrebszelllinie eingeordnet ist, ist identisch mit der Melanom-Zelllinie M14. Diese falsche Einordnung der Zelllinie MDA-MB-435 wurde 2007 von Rae und Mitarbeitern aufgeklärt.¹⁵⁴

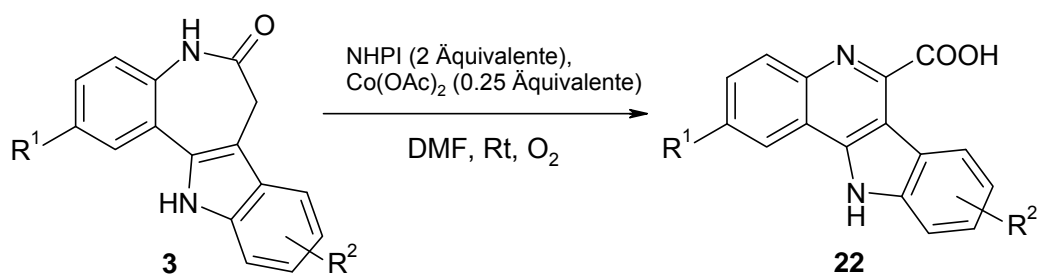
5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden selektive Inhibitoren NAD^+ -abhängiger Enzyme synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität gegenüber der mitochondrialen Malatdehydrogenase (mMDH) und humanen Sirtuinen getestet. Einige ausgewählte Vertreter wurden außerdem beim National Cancer Institut (NCI, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität an humanen Krebszelllinien getestet.

Ausgehend von Paullonen (7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-onen, **3**) wurde eine Substanzbibliothek von 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-onen **5** synthetisiert und die Stoffklasse der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** erschlossen.

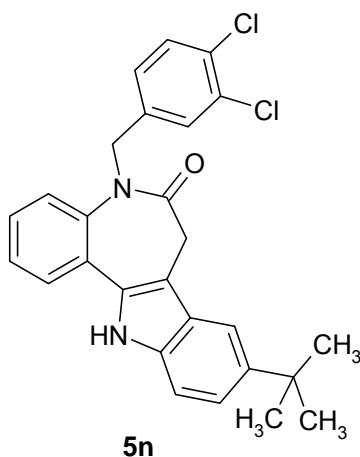
**5****22**

Die zuvor als Nebenreaktion entdeckte Ringkontraktion von Paullonen **3** zu 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** bei Reaktion mit *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und Kontakt zu Luftsauerstoff wurde in dieser Arbeit ausführlich untersucht. So konnte für die Umlagerung des siebengliedrigen Benzazepinon-Ringgerüsts in das aromatische Chinolinsystem durch Reaktion von **3** mit *N*-Hydroxyphthalimid, Cobalt(II)acetat und Sauerstoff ein Syntheseverfahren mit zufriedenstellenden Ausbeuten (30-70%) der gewünschten Zielstrukturen **22** etabliert werden.



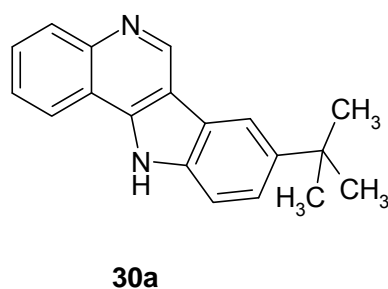
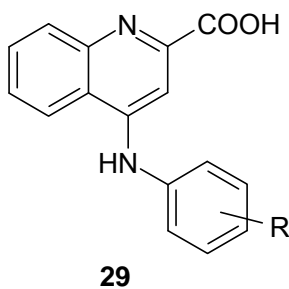
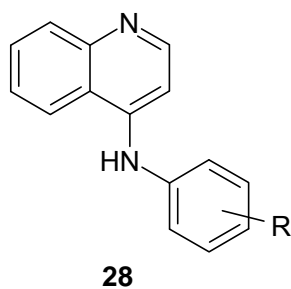
Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus unterstützen die Annahme einer radikalischen Initiation der Umlagerung.

Alle Verbindungen **5** und **22** sind Inhibitoren der NAD^+ -abhängigen mitochondrialen Malatdehydrogenase (mMDH) mit IC_{50} -Werten im niedrig mikromolaren Konzentrationsbereich. Für den aktivsten Vertreter der am Lactam-Stickstoff benzylierten Paullone **5n** konnte in Kinetikuntersuchungen ein NAD^+ -kompetitiver Hemmmechanismus nachgewiesen werden.



$\text{IC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$

Die als Strukturanaloga zu **22** im Rahmen der Arbeit dargestellten 4-Anilinochinoline **28**, die Carbonsäuren **29** und das 8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin (**30a**) zeigen keine bzw. eine deutlich schwächere mMDH-inhibitorische Aktivität als die Verbindungsklassen **5** und **22**.



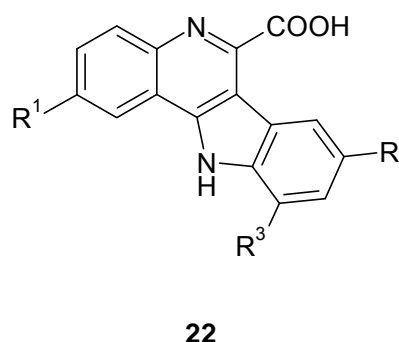
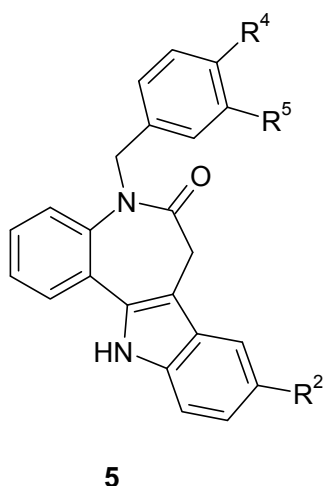
Die Verbindungen **5** und **22** sind Inhibitoren humaner Sirtuine mit einer Präferenz für das Sirtuin SIRT2. Die aktivsten Vertreter, das 9-Brom-5-(3,4-dichlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5k**) und die 8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22d**), sind mit IC₅₀-Werten um 30 µM in ihrer Aktivität vergleichbar mit Sirtinol, einem bekannten und umfangreich untersuchten Sirtuin-inhibitor.

Die Verbindung **5n** zeigte im *in vitro* Tumorzelllinien-Screening des NCI eine leichte wachstumshemmende Wirkung auf verschiedene Zelllinien mit einer Präferenz für Leukämiezelllinien.

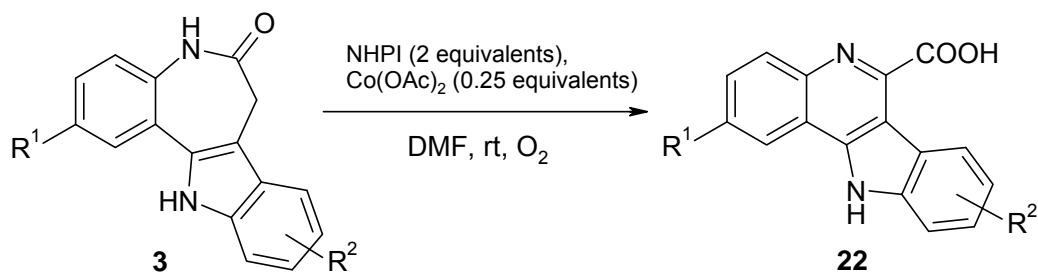
6 Summary

The thesis reports the synthesis and biological evaluation of inhibitors of NAD^+ -dependent enzymes, such as mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) and human sirtuins. Some selected active compounds were also investigated concerning their antiproliferative activity by the National Cancer Institute (NCI).

Starting from paullones (7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ones, **3**) a library of 5-benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ones **5** was synthesised and a class of new heterocyclic compounds, 11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acids **22**, was established.

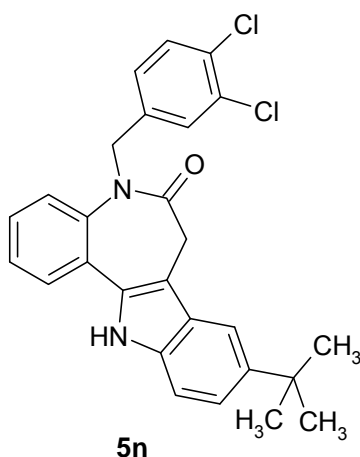


The previously as side reaction reported ring contraction of paullones **3** furnishing 11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acids **22** after reaction with *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) and contact to atmospheric oxygen was extensively examined. A synthetic procedure for the rearrangement of the seven-membered benzazepinone scaffold to the aromatic quinoline system by the use of *N*-hydroxyphthalimide, cobalt(II)acetate and molecular oxygen was developed. The desired structures **22** were obtained in satisfying yields (30-70%).



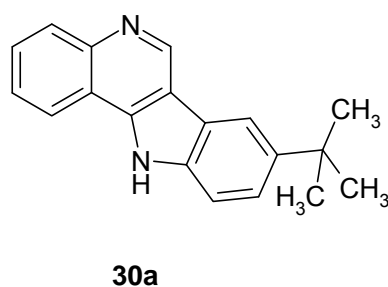
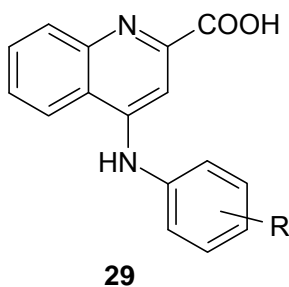
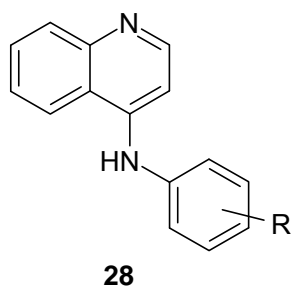
Studies of the reaction mechanism suggest a radical initiation of the rearrangement process.

All compounds **5** and **22** are inhibitors of the mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) with IC₅₀ values in the low micromolar range. Kinetic studies with the most active compound of all benzylated paullones **5n** demonstrated an NAD⁺-competitive mechanism for mMDH-inhibition.



IC₅₀ = 0.8 μM

The 4-anilinoquinolines **28**, the corresponding carboxylic acids **29** and the 8-*tert*-butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline (**30a**) were prepared as structure analogues of **22**. These compounds failed to show interesting activity towards mMDH comparable to compound classes **5** or **22**, respectively.



The compounds **5** and **22** are inhibitors of human sirtuins with a preference for the sirtuin SIRT2. The inhibitory potential of the most active derivatives, 9-bromo-5-(3,4-dichlorobenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one (**5k**) and 8-*tert*-butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acid (**22d**), is with IC_{50} values of about 30 μ M comparable to the one of sirtinol, a well-known und examined inhibitor of sirtuins.

Compound **5n** showed a moderate growth inhibition towards several tumor cell lines in the *in vitro* cell line screening of the NCI with a preference for leukemia cell lines.

7 Experimenteller Teil

Die 2-iodsubstituierten Paullone **3p**, **3q**, **3r** und **3s**, die zur Synthese der korrespondierenden 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22p-s** eingesetzt wurden, wurden von Frau Dr. Christina Reichwald zur Verfügung gestellt. Entsprechende Arbeitsvorschriften: siehe Literatur³²

7.1 Allgemeines

Analytische Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC):

La Chrom Elite, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000; Trennsäule Merck LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18 (5 µM).

Probenvorbereitung:

Ca. 1 mg der zu vermessenden Substanz wird in 800 µl DMSO gelöst. 200 µl dieser Stammlösung werden erneut mit 800 µl DMSO verdünnt. (Die gemessene Absorption soll in einem Bereich zwischen 300 bis 800 mAU liegen. Bei abweichenden Werten wird die Stammlösung entsprechend stärker bzw. geringer verdünnt.). Die verdünnte Lösung wird durch einen Acrodisc® MHP 13 µM-Filter filtriert.

Elution:

Injektionsvolumen: 10 µl; isokratische Elution; Flussrate 1.000 ml/min, Gesamtlaufzeit: 15 Minuten; für die untersuchte Substanz wird eine Gesamtretentionszeit (t_{m+s}) zwischen 3 und 8 Minuten angestrebt.

Elutionsmittel:

ACN/H₂O Gemische; ACN/H₂O + Ameisensäure Gemische (Ameisensäure (0.05 %) in Aqua bidest.; pH = 2.5 - 2.7); ACN/H₂O + TFA Gemische (Aqua bidest. mit Trifluoressigsäure auf pH = 2.3 - 2.5 einstellen).

Detektion:

Diodenarray-Detektor (DAD) bei 254 und 280 nm.

Auswertung:

Verwendete Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.;

Integration der Peakflächen nach der 100%-Methode; Integrationsausschluss: 1.55 Minuten; Threshold 500; Bestimmung der Nettoretentionszeit (t_s) und Totzeit (t_m) bezogen auf DMSO; Absorptionsmaxima (λ_{\max}) aus den mittels DAD gewonnenen UV-Spektren.

Dünnschichtchromatographie:

DC-Mikroarten Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, Fa. Macherey-Nagel, Düren; Detektion unter UV-Licht der Wellenlängen 254 und 366 nm.

Häufig verwendete Lösungsmittelgemische für die Dünnschichtchromatographie:

Ethylacetat und Toluol (1 + 1 und 1 + 10, z. T. unter Zusatz von Ameisensäure, 1%)

Ethylacetat und Ethanol (1 + 1 und 1 + 2)

Verwendete Reagenzien für den Nachweis spezieller funktioneller Gruppen bei der Dünnschichtchromatographie:

Ehrlichs Reagenz

Nachweis von primären aromatischen Aminen mit 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd (1.0 g in 70 ml Methanol und 30 ml konz. Salzsäure) unter Bildung eines gelb gefärbten Azomethins.

Elementaranalytik:

CE Instruments Flash EA[®] 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest; Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS):

Quadrupol-Massenspektrometer: 3200 Q Trap[®] LC/MS/MS-System, Applied Biosystems, Kalifornien, USA; Selektion eines bestimmten Ions im ersten Quadrupol und kontrollierte Fragmentierung im nachgeschalteten Quadrupol.

Vorgeschaltete Flüssigchromatographie: Agilent Technologies 1200 Series

Die LC-MS-Messungen wurden von Dr. Till Beuerle vom Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig durchgeführt.

IR-Spektroskopie:

Die festen Substanzen wurden als KBr-Presslinge vermessen. Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA.

Kernresonanzspektroskopie:

Bruker Avance DRX-400 (^1H -NMR-Messung: 400 MHz, ^{13}C -NMR-Messung: 100.6 MHz), Bruker Avance II-600 (^1H -NMR-Messung: 600 MHz, ^{13}C -NMR-Messung: 150.9 MHz) (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der Technischen Universität Braunschweig).

Lösungsmittel: DMSO- d_6 (bei schwer löslichen Verbindungen unter Zusatz von TFA).

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS).

^1H -NMR-Spektren: Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der δ_{TMS} -Skala; Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration; Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett; br = vorliegendes Signal tritt verbreitert auf.

^{13}C -NMR-Spektren: Der Zusatz (2C) bedeutet, dass ein überlagertes Signal zweier magnetisch äquivalenter ^{13}C -Kohlenstoffatome vorliegt. Die Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt aufgenommen. Es wurde routinemäßig zusätzlich eine ^{13}C -DEPT135-Messung durchgeführt.

Massenspektrometrie:

Finnigan-MAT 95 (Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Braunschweig); Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV, Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS; hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard: Perfluorkerosin.

Säulenchromatographie:

Kieselgel 60 (unter 0.063 mm), Fa. Merck, Darmstadt.
Säulendurchmesser 3 cm, Füllhöhe 30–35 cm.

Schmelzpunkte:

Electrothermal IA 9100 instrument, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien.

UV-Spektroskopie:

UV/Vis-Spektrometer, Specord® 200, Zweistrahlphotometer mit temperierbarem Küvettenhalter; Fa. Analytik Jena, Jena.

Gerätesoftware zur Auswertung: Winaspect®

Verwendete Küvetten: Halbmikro-Einmalküvetten (Füllvolumen: 1.5 ml; Schichtdicke: 1 cm) aus Polymethylmethacrylat (PMMA), Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrech.

Verwendete Computersoftware:

GraphPad Prism®

Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® Version 4.00, GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA.

Kommerziell erworbene Chinolincarbonsäuren:

Die Verbindungen **23-27** wurden von der Specs GmbH, Berlin, erworben.

Reinigung und Trocknung von Lösungsmitteln:

Die Reinigung und Trocknung der verwendeten Lösungsmittel (Toluen, Tetrahydrofuran) erfolgte in Anlehnung an publizierte Methoden.¹⁵⁵

7.2 Synthesen und analytische Daten

AAV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-one **3a-o**

1 Äquivalent 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) bzw. 7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**) wird mit 1.5 Äquivalenten des jeweiligen Phenylhydrazins* (bzw. 1.5 Äquivalenten Phenylhydrazinhydrochlorid und 1.5 Äquivalenten Natriumacetat) in Eisessig (15 ml) suspendiert. Die Suspension wird bei 70 °C ein bis zwei Stunden gerührt. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte zum Hydrazon (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wird konzentrierte Schwefelsäure (0.1 ml) zugesetzt und bei 70 °C ein bis zwei Stunden weiter gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz in 5%ige Natriumacetat-Lösung (ca. 50 ml) gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit viel Wasser und Petrolether nachgewaschen und gegebenenfalls aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-one **5a-n**

1 Äquivalent des jeweiligen 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-ons **3** und 1 Äquivalent (bzw. 0.5 Äquivalente) Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%)* (Vorsicht! Natriumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) werden in getrocknetem THF (10-15 ml) unter Stickstoff-Atmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nachdem keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist, werden 1 Äquivalent (bzw. 0.5 Äquivalente) Benzylbromid bzw. das jeweilige Benzylbromid-Derivat zugesetzt. Der Reaktionsansatz wird so lange zum Rückfluss erhitzt, bis dünnschichtchromatographisch keine Zunahme des Produktfleckes mehr zu detektieren ist (1-5 h). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird Wasser (20-50 ml) zugesetzt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan (jeweils 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird mit Kieselgel 60

(1 g) versetzt und zur Trockne eingengt. Das isolierte Produktgemisch aus Paullon **3** und 5-Benzylpaullon **5** wird dann säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Ethylacetat/Petrolether (Siedebereich 35-70 °C) (1 + 1) aufgetrennt. Einige Verbindungen werden nach der säulenchromatographischen Trennung durch Umkristallisation aus 70%igem Ethanol weiter gereinigt.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22a-s**

Methode A:

1 Äquivalent des jeweiligen substituierten 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ons **3**, 2 Äquivalente *N*-Hydroxyphthalimid und 0.25 Äquivalente Cobalt(II)-acetat werden in DMF (3-10 ml, je nach Löslichkeit des jeweiligen Paullons) unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst. Die Lösung wird 8 Stunden bei 65-70 °C offen mit Kontakt zu Luftsauerstoff gerührt. Anschließend wird über den angegebenen Zeitraum weiter bei Raumtemperatur offen gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit einigen ml DMF, Ethanol und mit viel Wasser nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

Methode B:

1 Äquivalent des jeweiligen substituierten 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ons **3**, 2 Äquivalente *N*-Hydroxyphthalimid und 0.25 Äquivalente Cobalt(II)-acetat werden in DMF (3-10 ml, je nach Löslichkeit des jeweiligen Paullons) unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst. An einer Gaseinleitungsapparatur wird für 8 h Sauerstoff durch den Ansatz geleitet. Anschließend wird über den angegebenen Zeitraum weiter bei Raumtemperatur in einem offenen Kolben gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit einigen ml DMF, Ethanol und mit viel Wasser nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

AAV 4: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der *N*-Phenylchinolin-4-amine **28a-h** und der 4-Anilinochinoliniumhydrochloride **89a-c**

1 Äquivalent 4-Chlorchinolin bzw. 1 Äquivalent 4-Chlorchinaldin und 1 Äquivalent des jeweiligen Anilins* werden in absolutem Ethanol (10 ml) gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Bis zur vollständigen Umsetzung der Edukte wird weiter zum Rückfluss erhitzt. (Dünnschichtchromatographische Kontrolle, Nachweis des Anilins mit Ehrlichs Reagenz). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in wässriger Natronlauge (ca. 10%ig) (10 ml) aufgekocht. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Wird der Rückstand nicht in wässriger Lauge aufgekocht, sondern direkt aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert, werden die korrespondierenden Salze (4-Anilinochinoliniumhydrochloride) **89** der Verbindungen erhalten.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

AAV 5: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 4-Anilinochinolin-2-carbonsäuren **29a** und **b**

1 Äquivalent 4-Chlorchinolin-2-carbonsäure (**94**) und 1 Äquivalent des jeweiligen Anilins* werden in absolutem Ethanol (10 ml) suspendiert und zum Rückfluss erhitzt. Bis zur vollständigen Umsetzung der Edukte wird weiter zum Rückfluss erhitzt. (Dünnschichtchromatographische Kontrolle, Nachweis des Anilins mit Ehrlichs Reagenz). Der entstehende kräftig gelbe Niederschlag wird direkt abgesaugt und aus 70%igem Ethanol umkristallisiert.

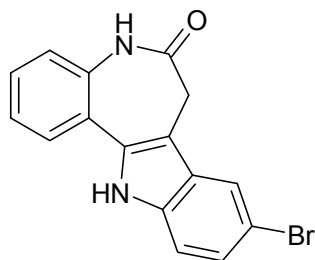
*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

AAV 6: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der *N,N'*-Bis-(11*H*-indolo[3,2-*c*]-chinolin-6-carbonsäuren) **86**

1 Äquivalent 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on **3** und 3 Äquivalente 2,3-Dichlor-5,6-dicyanbenzochinon (DDQ)* werden in DMF (3-5 ml) gelöst. Die Lösung wird offen mit Kontakt zu Luftsauerstoff gerührt, bis sich nach mehreren Tagen ein Niederschlag gebildet hat. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und gründlich mit einigen ml DMF, Ethanol (ca. 50 ml) und Wasser (ca. 200 ml) nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

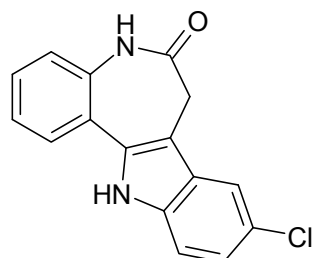
9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**, Kenpaullon)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (350 mg, 2.00 mmol), 4-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (671 mg, 3.00 mmol) und Natriumacetat (246 mg, 3.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Dioxan erhält man 482 mg (74%) eines bräunlichen Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁷⁰: > 330 °C); HPLC: 99.5 % bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm, t_s = 2.75 min, t_m = 1.01 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{\max} : 230, 318 nm.

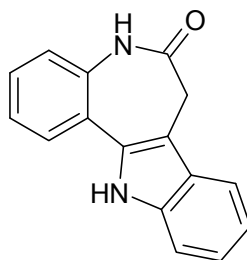
9-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3b**)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (350 mg, 2.00 mmol), 4-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (537 mg, 3.00 mmol) und Natriumacetat (246 mg, 3.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 337 mg (60%) gelb-bräunliche Kristalle.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁷⁰: > 330 °C); HPLC: 96.4% bei 254 nm und 94.8% bei 280 nm, t_s = 6.18 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{\max} : 231, 317 nm.

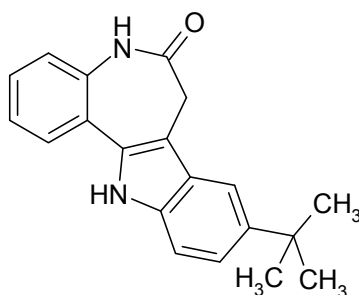
7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3c**)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (350 mg, 2.00 mmol) und Phenylhydrazin (295 μ l, 3.00 mmol). Man erhält 450 mg (91%) eines hell-gelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁷⁰: > 330 °C); HPLC: 98.6 % bei 254 nm und 97.5% bei 280 nm, t_s = 3.11 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{\max} : 230, 312 nm.

9-*tert*-Butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3d**)

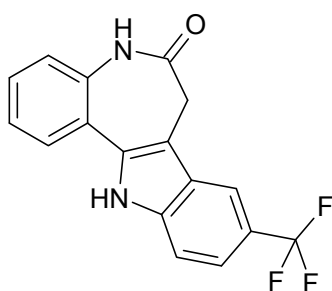


Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (350 mg, 2.00 mmol), 4-*tert*-Butylphenylhydrazin-Hydrochlorid (602 mg, 3.00 mmol) und Natriumacetat (246 mg, 3.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 363 mg (60%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 350-370 °C (Zersetzung unter Verfärbung); IR (KBr): 3205 cm⁻¹ (NH), 3056 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2962 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, 3x CH₃), 3.50 (s, 2H, Azepin-CH₂), 7.23-7.28 (m, 3H, ArH), 7.33-7.38 (m, 2H, ArH), 7.59 (d, 1H, J = 1.8 Hz, ArH), 7.72 (dd, 1H, J = 7.7/1.6 Hz, ArH), 10.08 (s, 1H, Lactam-NH), 11.42 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin-CH₂); 31.8 (3C) (CH₃); 34.3 (C(CH₃)₃); 111.0, 113.4, 120.4, 122.2, 123.6, 126.7, 127.8 (tert. C); 107.7, 123.1,

126.3, 132.5, 135.3, 135.7, 141.5, 171.7 (quart. C); $C_{20}H_{20}N_2O$ [304.39]; ber. C 78.92, H 6.62, N 9.20; gef. C 78.68, H 6.74, N 8.86; HRMS (EI): m/z (%) = 304 (34) $[M]^+$; HRMS: ber. 304.1575; gef. 304.1581; HPLC: 99.7% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, t_s = 4.19 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max} : 228, 315 nm.

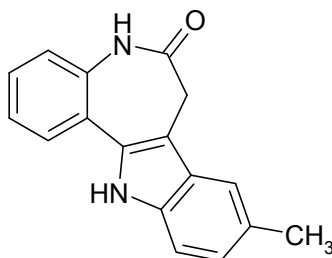
9-Trifluormethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3e**)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (350 mg, 2.00 mmol) und 4-Trifluormethylphenylhydrazin (528 mg, 3.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 225 mg (36%) hellbraune Kristalle.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁶⁷: > 330 °C); HPLC: 98.8% bei 254 nm und 96.9% bei 280 nm, t_s = 3.11 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max} : 233, 314 nm.

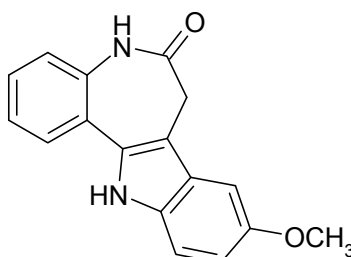
9-Methyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3f**)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (350 mg, 2.00 mmol), *p*-Tolylhydrazin-Hydrochlorid (476 mg, 3.00 mmol) und Natriumacetat (246 mg, 3.00 mmol). Man erhält 454 mg (87%) eines hellbraunen Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.³⁰: > 330 °C); HPLC: 96.9% bei 254 nm und 96.6% bei 280 nm, t_s = 5.36 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 235, 314 nm.

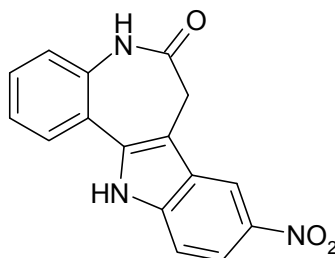
9-Methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3g**)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (263 mg, 1.50 mmol), 4-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (403 mg, 2.30 mmol) und Natriumacetat (189 mg, 2.30 mmol). Man erhält 345 mg (83%) eines beige-grauen Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.³⁰: > 330 °C); HPLC: 95.2% bei 254 nm und 93.2% bei 280 nm, t_s = 1.00 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O; 10:90), λ_{max} : 226, 317 nm.

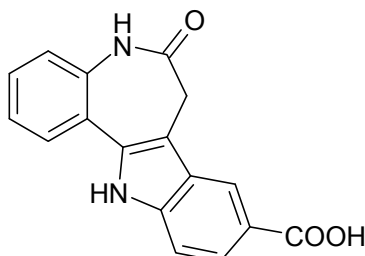
9-Nitro-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3h**, Alsterpaullon)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (175 mg, 1.00 mmol) und 4-Nitrophenylhydrazin (230 mg, 1.50 mmol). Der entstandene Niederschlag wird direkt aus Eisessig abgesaugt und nicht in Natriumacetatlösung gegossen. Der Niederschlag wird mit viel Wasser nachgewaschen und in Ethanol aufgeköcht. Man erhält 99 mg (33%) eines kräftig gelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁶⁷: > 330 °C); HPLC: 99.7% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, t_s = 4.66 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 35:65), λ_{max} : 222, 244, 300 nm.

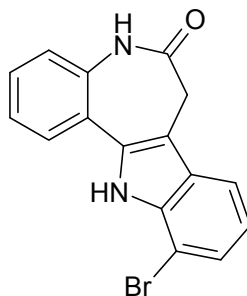
6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonsäure (**3i**)



Nach AAV 1 (bei der Synthese von **3i** wurde der Ansatz bei 90 °C in Eisessig gerührt⁶⁵) aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (175 mg, 1.00 mmol) und 4-Hydrazinobenzoessäure (228 mg, 1.50 mmol). Man erhält 175 mg (60%) eines weißen Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁶⁵: > 330 °C); HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, t_s = 6.33 min, t_m = 1.04 min (ACN/H₂O + TFA; 25:75), λ_{max} : 244, 274 nm.

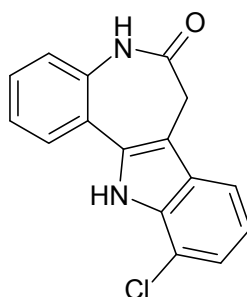
11-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3j**)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (350 mg, 2.00 mmol), 2-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (671 mg, 3.00 mmol) und Natriumacetat (246 mg, 3.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 165 mg (25%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.³⁰: > 330 °C); HPLC: 87.8 % bei 254 nm und 83.1 % bei 280 nm, t_s = 2.90 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max} : 231, 311 nm.

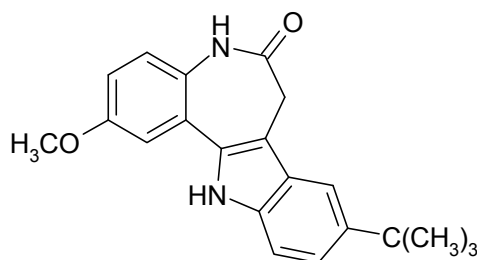
11-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3k**)



Nach AAV 1 aus 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**) (175 mg, 1.00 mmol), 2-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (269 mg, 1.50 mmol) und Natriumacetat (123 mg, 1.50 mmol). Man erhält 238 mg (84%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁷⁰: > 330 °C); HPLC: 96.1% bei 254 nm und 95.9% bei 280 nm, t_s = 2.63 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 20:80), λ_{max} : 231, 312 nm.

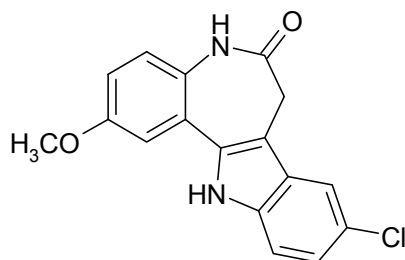
9-*tert*-Butyl-2-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (3l)



Nach AAV 1 aus 7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**) (205 mg, 1.00 mmol), 4-*tert*-Butylphenylhydrazin-Hydrochlorid (301 mg, 1.50 mmol) und Natriumacetat (123 mg, 1.00 mmol). Man erhält 249 mg (74%) eines hellbraunen Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁷¹: > 330 °C (Zers.)); HPLC: 95.8% bei 254 nm und 93.3% bei 280 nm, t_s = 1.78 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O; 65:35), λ_{max} : 230, 321 nm.

9-Chlor-2-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (3m)

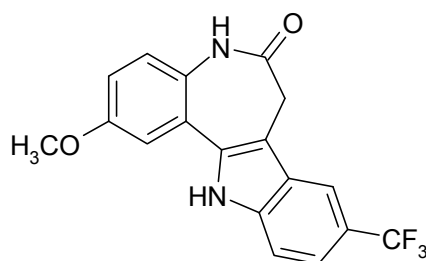


Nach AAV 1 aus 7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**) (164 mg, 0.800 mmol), 4-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (215 mg, 1.20 mmol) und Natriumacetat (98 mg, 1.2 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol/Acetonitril erhält man 114 mg (46%) hellbraune Kristalle.

Schmp.: > 330 °C; IR (KBr): 3313 cm⁻¹ (NH), 3074 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1643 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.49 (s, 2H, Azepin-CH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 7.01 (dd, 1H, J = 8.9/3.0 Hz, ArH), 7.16-7.19 (m, 2H, ArH), 7.28 (d, 1H,

$J = 3.0$ Hz, ArH), 7.45 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.78 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, ArH), 9.96 (s, 1H, Lactam-NH), 11.83 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.1 (Azepin- CH_2); 54.3 (OCH_3); 109.4, 111.8, 114.1, 116.3, 120.9, 122.6 (tert. C); 106.4, 122.2, 126.4, 128.0, 133.0, 134.5, 154.2, 170.0 (quart. C; ein C nicht detektiert bei 512 Scans); $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ [312.74]; ber. C 65.29, H 4.19, N 8.69; gef. C 65.09, H 4.15, N 8.41; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, $t_s = 1.44$ min, $t_m = 1.02$ min (ACN/ H_2O ; 10:90), λ_{max} : 234, 322 nm.

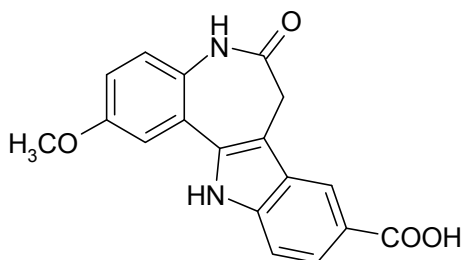
2-Methoxy-9-trifluormethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (3n)



Nach AAV 1 aus 7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**) (410 mg, 2.00 mmol) und 4-Trifluormethylphenylhydrazin (528 mg, 3.00 mmol). Man erhält 400 mg (58%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.¹⁵⁶: > 330 °C); HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, $t_s = 3.43$ min, $t_m = 1.02$ min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 237, 318 nm.

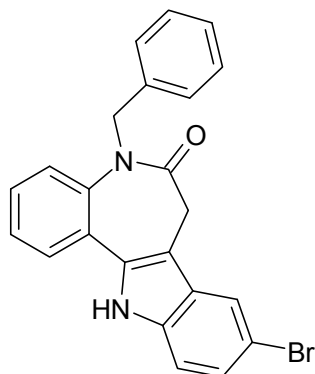
2-Methoxy-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonsäure (**3o**)



Nach AAV 1 (bei der Synthese von **3o** wurde der Ansatz bei 90 °C in Eisessig gerührt) aus 7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**) (410 mg, 2.00 mmol) und 4-Hydrazinobenzoessäure (456 mg, 3.00 mmol). Man erhält 440 mg (68%) eines hellbraunen Pulvers.

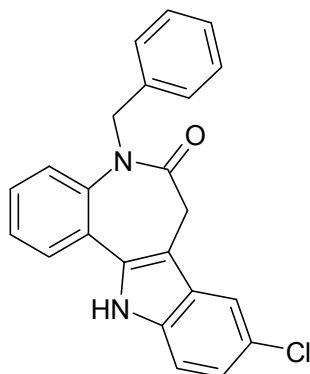
Schmp.: 345-355 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3196 cm⁻¹ (NH), 1670 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.52 (s, 2H, Azepin-CH₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 7.02 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.8 Hz, ArH), 7.20 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, ArH), 7.30 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, ArH), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.6/0.7 Hz, ArH), 7.81 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.7 Hz, ArH), 8.33 (m, 1H, ArH), 10.01 (s, 1H, Lactam-NH), 12.02 (s, 1H, Indol-NH), 12.57 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.3 (Azepin-CH₂); 55.4 (OCH₃); 110.4, 111.1, 115.2, 120.5, 123.3, 123.7 (tert. C); 108.8, 121.7, 123.2, 125.9, 129.1, 134.0, 139.5, 155.3, 168.1, 171.0 (quart. C); C₁₈H₁₄N₂O₄ [322.32]; ber. C 67.07, H 4.38, N 8.69; gef. C 66.55, H 4.42, N 8.15; MS (EI): *m/z* (%) = 322 (100) [M]⁺; HRMS: ber.322.0953; gef. 322.0959; HPLC: 99.7% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*_s = 3.54 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 30:70), λ_{max}: 249, 272 nm.

5-Benzyl-9-brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5a**)



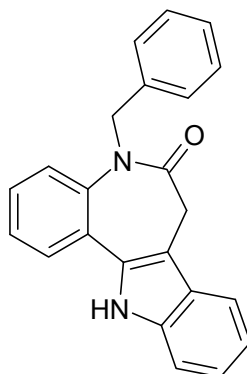
Nach AAV 2 aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**) (327 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und Benzylbromid (60 μ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 3.5 h. Man erhält nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol/96%igem Ethanol 78 mg (38%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 245 °C (Lit.⁶⁷: 248 °C); C₂₃H₁₇BrN₂O [417.31]; ber. C 66.20, H 4.11, N 6.71; gef. C 65.79, H 4.14, N 6.15; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*_s = 4.47 min, *t*_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 231, 316 nm.

5-Benzyl-9-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5b**)

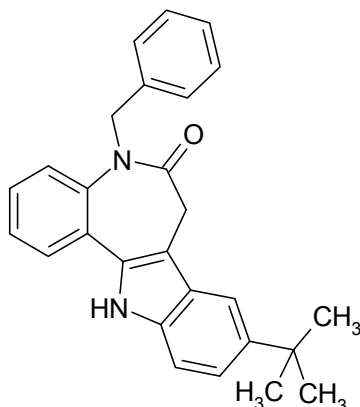
Nach AAV 2 aus 9-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3b**) (283 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und Benzylbromid (60 μ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Man erhält nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol/96%igem Ethanol 50 mg (27%) weißes Pulver.

Schmp.: 240 °C; IR (KBr): 3301 cm^{-1} (NH), 3030 cm^{-1} (CH aromatisch), 1646 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 3.16 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H_2O -Signal), 4.03 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.02 und 5.14 (2 br s, 2H, Benzyl- CH_2 , überlagert), 6.89-6.91 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.10-7.16 (m, 3H, ArH), 7.19 (dd, 1H, $J = 8.7/2.1$ Hz, ArH), 7.32-7.34 (m, 1H, ArH), 7.39-7.42 (m, 1H, ArH), 7.47 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.58 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.67 (dd, 1H, $J = 7.9/1.5$ Hz, ArH), 7.83 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, ArH), 11.95 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.0 (Azepin- CH_2), 50.6 (Benzyl- CH_2); 111.7, 116.2, 120.7, 122.9, 123.8, 124.8 (2C), 125.2, 125.9, 126.8 (2C), 127.0 (tert. C); 108.0, 122.4, 124.3, 125.6, 132.6, 134.3, 136.4, 137.8, 168.7 (quart. C); $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}$ [372.85]; ber. C 74.09, H 4.60, N 7.51; gef. C 71.23, H 4.67, N 7.39; MS (EI): m/z (%) = 372 (80) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 372.1029; gef. 372.1035; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, $t_s = 3.63$ min, $t_m = 1.02$ min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 232, 315 nm.

5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**5c**)

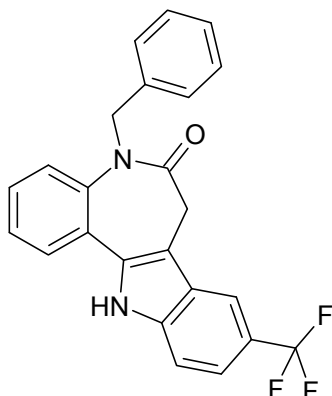
Nach AAV 2 aus 7,12-Dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**3c**) (248 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension (60 % in Mineralöl) (40 mg, 1.0 mmol) und Benzylbromid (120 μ l, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 4.5 h. Nach Säulenchromatographie erhält man 85 mg (25%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 245-246 °C (Lit.¹⁵⁷: 214-216 °C); IR (KBr): 3262 cm^{-1} (NH), 3055 cm^{-1} (CH aromatisch), 1639 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 3.18 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H_2O -Signal), 3.98 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.03 und 5.15 (2 br s, 2H, Benzyl- CH_2 , überlagert), 6.90-6.92 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.08-7.17 (m, 4H, ArH), 7.18-7.22 (m, 1H, ArH), 7.30-7.39 (m, 2H, ArH), 7.47 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.3/1.2$ Hz, ArH), 7.68 (dd, 1H, $J = 7.6/1.8$ Hz, ArH), 7.71 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 11.70 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.3 (Azepin- CH_2), 51.7 (Benzyl- CH_2); 111.3, 117.9, 118.8, 121.9, 123.8, 124.8, 125.9 (2C), 126.2, 126.9, 127.6, 127.8 (2C) (tert. C); 109.4, 125.6, 125.9, 132.0, 137.0, 137.5, 138.6, 169.8 (quart. C) (die in der zitierten Veröffentlichung aufgeführten NMR-Daten weichen von den im Rahmen dieser Arbeit experimentell erhobenen Daten ab); $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ [338.40]; ber. C 81.63, H 5.36, N 8.28; gef. C 80.63, H 5.50, N 7.88; MS (EI): m/z (%) = 338 (86) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 338.1419; gef. 338.1415; HPLC: 98.5% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, $t_s = 2.17$ min, $t_m = 1.00$ min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 230, 310 nm.

5-Benzyl-9-*tert*-butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (5d)

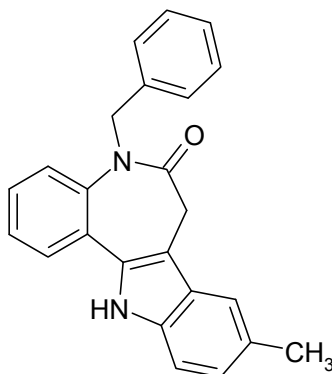
Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3d**) (305 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension (60% in Mineralöl) (40 mg, 1.0 mmol) und Benzylbromid (120 μ l, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 8 h. Nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 95 mg (24%) eines hellbeigen Pulvers.

Schmp.: 211-212 °C; IR (KBr): 3233 cm^{-1} (NH), 2963 cm^{-1} und 2951 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1637 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, 3x CH₃), 3.15 (br s, 1H, Azepin-CH), 4.00 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.09 (br s, 2H, Benzyl-CH₂), 6.89-6.91 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.08-7.16 (m, 3H, ArH), 7.28-7.32 (m, 2H, ArH), 7.35-7.41 (m, 2H, ArH), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.2/1.1$ Hz, ArH), 7.65-7.66 (m, 2H, ArH), 11.57 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 30.7 (Azepin-CH₂); 31.8 (3C) (CH₃); 34.4 (C(CH₃)₃); 51.9 (Benzyl-CH₂); 111.2, 113.6, 120.6, 125.1, 125.8, 126.4 (2C), 126.6, 127.1, 127.7, 128.2 (2C) (tert. C); 110.0, 124.2, 126.5, 132.4, 135.6, 137.9, 138.8, 141.6, 170.3 (quart. C); C₂₇H₂₆N₂O [394.51]; ber. C 82.20, H 6.64, N 7.10; gef. C 81.72, H 6.91, N 6.87; MS (EI): m/z (%) = 394 (100) [M]⁺; HRMS: ber. 394.2045; gef. 394.2047; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, t_s = 6.79 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 227, 315 nm.

5-Benzyl-9-trifluormethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (5e)

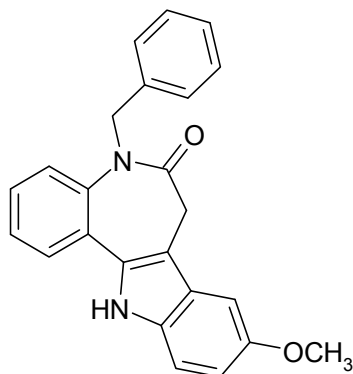
Nach AAV 2 aus 9-Trifluormethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3e**) (316 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und Benzylbromid (60 μ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Man erhält nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol 32 mg (16%) orange Kristalle.

Schmp.: 224 °C; IR (KBr): 3305 cm^{-1} (NH), 1648 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.21 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H₂O-Signal), 4.18 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.02 und 5.17 (2 br s, 2H, Benzyl-CH₂, überlagert), 6.90-6.91 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.10-7.17 (m, 3H, ArH), 7.35 (dt, 1H, $J = 7.5/1.1$ Hz, ArH), 7.42-7.45 (m, 1H, ArH), 7.49 (dd, 1H, $J = 8.7/1.7$ Hz, ArH), 7.61 (dd, 1H, $J = 8.4/1.0$ Hz, ArH), 7.65 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.70 (dd, 1H, $J = 7.8/1.6$ Hz, ArH), 8.22 (s, 1H, ArH), 12.25 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.3 (Azepin-CH₂), 52.0 (Benzyl-CH₂); 112.3, 116.2 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 118.4 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 124.3, 125.2, 126.2 (2C), 126.6, 127.3, 128.2 (2C), 128.6 (tert. C); 110.6, 120.0 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 31.2$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 125.4 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 271.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 125.5, 134.5, 137.7, 138.6, 139.2, 170.1 (1 quartäres C nicht zu detektieren bei 512 Scans) (quart. C); C₂₄H₁₇F₃N₂O [406.40]; ber. C 70.93, H 4.22, N 6.89; gef. C 70.82, H 4.22, N 6.51; MS (EI): m/z (%) = 406 (75) [M]⁺; HRMS: ber. 406.1293; gef. 406.1294; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, $t_s = 4.62$ min, $t_m = 1.02$ min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 233, 312 nm.

5-Benzyl-9-methyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (5f)

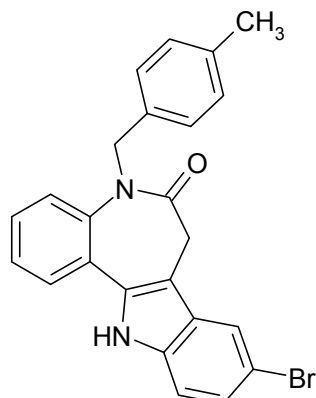
Nach AAV 2 aus 9-Methyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3f**) (262 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und Benzylbromid (120 μ l, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 65 mg (36%) gelb-orange Kristalle.

Schmp.: 214 °C; IR (KBr): 3322 cm^{-1} (NH), 3058 cm^{-1} und 3028 cm^{-1} (CH aromatisch), 2910 cm^{-1} und 2856 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1650 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.14 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H₂O-Signal), 3.93 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.02 und 5.13 (2 br s, 2H, Benzyl-CH₂, überlagert), 6.90-6.91 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.02 (dd, 1H, J = 8.3/1.7 Hz, ArH), 7.10-7.16 (m, 3H, ArH), 7.31 (dt, 1H, J = 7.5/1.2 Hz, ArH), 7.35-7.37 (m, 2H, ArH), 7.49 (d, 1H, J = 0.6 Hz, ArH), 7.57 (dd, 1H, J = 8.3/1.1 Hz, ArH), 7.66 (dd, 1H, J = 7.7/1.7 Hz, ArH), 11.58 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.1 (CH₃); 31.6 (Azepin-CH₂), 52.0 (Benzyl-CH₂); 111.3, 117.7, 123.8, 124.1, 125.1, 126.2 (2C), 126.5, 127.1, 127.8, 128.1 (2C) (tert. C); 109.2, 126.1, 126.3, 127.7, 132.4, 135.7, 137.8, 138.9, 170.1 (quart. C); C₂₄H₂₀N₂O [352.43]; ber. C 81.79, H 5.72, N 7.95; gef. C 81.94, H 5.96, N 7.74; HPLC: 99.2% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, t_s = 3.62 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 228, 314 nm.

5-Benzyl-9-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (5g)

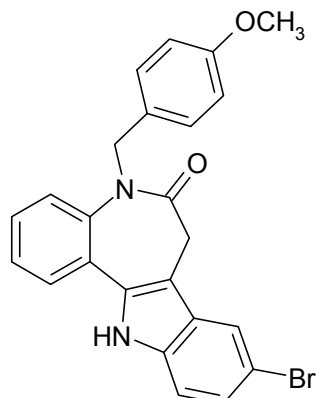
Nach AAV 2 aus 9-Methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3g**) (278 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und Benzylbromid (60 μ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 15 mg (8%) gelb-orange Kristalle.

Schmp.: 222 °C (Lit.¹⁵⁷: 213-215 °C); IR (KBr): 3429 cm^{-1} (NH), 3030 cm^{-1} (CH aromatisch), 1635 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 3.15 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H₂O-Signal), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.03 und 5.14 (2 br s, 2H, Benzyl-CH₂, überlagert), 6.83 (dd, 1H, J = 8.7/2.5 Hz, ArH), 6.91-6.92 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.10-7.17 (m, 3H, ArH), 7.23 (d, 1H, J = 2.5 Hz, ArH), 7.31 (dt, 1H, J = 7.5/1.2 Hz, ArH), 7.34-7.37 (m, 2H, ArH), 7.57 (dd, 1H, J = 8.3/1.1 Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, J = 7.7/1.7 Hz, ArH), 11.56 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.2 (Azepin-CH₂), 50.7 (Benzyl-CH₂), 53.9 (OCH₃), 98.2, 111.0, 111.4, 122.8, 123.7, 124.9 (2C), 125.2, 125.7, 126.4, 126.8 (2C) (tert. C); 108.3, 124.9, 125.0, 131.1, 131.5, 136.5, 137.5, 152.2, 168.9 (quart. C) (die in der zitierten Veröffentlichung aufgeführten NMR-Daten weichen leicht von den im Rahmen dieser Arbeit experimentell erhobenen Daten ab); C₂₄H₂₀N₂O₂ [368.43]; MS (EI): m/z (%) = 368 (83) [M]⁺; HRMS: ber. 368.1525; gef. 368.1529; HPLC: 96.3% bei 254 nm und 96.6% bei 280 nm, t_s = 2.08 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 222, 315 nm.

9-Brom-5-(4-methylbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5h**)

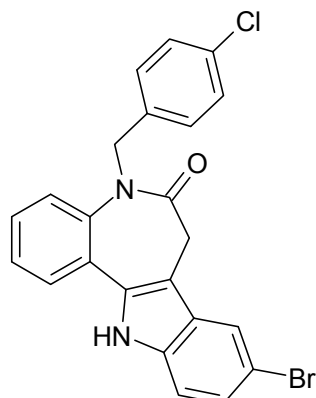
Nach AAV 2 aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**) (164 mg, 0.500 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und 4-Methylbenzylbromid (93 mg, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 2.5 h. Nach Säulenchromatographie erhält man 50 mg (23%) eines hellen Pulvers.

Schmp.: 274 °C; IR (KBr): 3318 cm⁻¹ (NH), 2920 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1639 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.17 (s, 3H, CH₃), 3.14 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H₂O-Signal), 4.01 (br s, 1H, Azepin-CH), 4.98 und 5.09 (2 br s, 2H, Benzyl-CH₂, überlagert), 6.76-6.78 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 6.92-6.94 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.29-7.34 (m, 2H, ArH), 7.38-7.44 (m, 2H, ArH), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.0 Hz, ArH), 7.66 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.6 Hz, ArH), 7.96 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 11.93 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.4 (CH₃); 31.3 (Azepin-CH₂), 51.7 (Benzyl-CH₂); 113.5, 120.6, 124.3, 124.6, 125.2, 126.3 (2C), 127.2, 128.3, 128.7 (2C) (tert. C); 109.3, 111.7, 125.7, 127.7, 133.9, 134.6, 135.6, 135.9, 139.1, 170.0 (quart. C); C₂₄H₁₉BrN₂O [431.33]; ber. C 66.83, H 4.44, N 6.49; gef. C 64.61, H 4.51, N 5.59; MS (EI): *m/z* (%) = 430 (52) [M]⁺; HRMS: ber. 430.0681; gef. 430.0676; HPLC: 97.2% bei 254 nm und 97.1% bei 280 nm, *t*_s = 2.48 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O; 70:30), λ_{max}: 226, 316 nm.

9-Brom-5-(4-methoxybenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (5i)

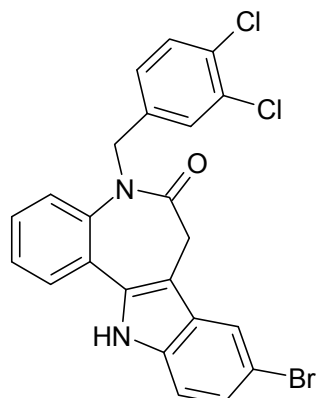
Nach AAV 2 aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**) (164 mg, 0.500 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und 4-Methoxybenzylbromid (72 μ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Nach Säulenchromatographie erhält man 62 mg (28%) eines weißen Pulvers.

Schmp.: 236 °C; IR (KBr): 3319 cm^{-1} (NH), 2926 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1638 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 3.11 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H_2O -Signal), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 4.02 (br s, 1H, Azepin-CH), 4.91 und 5.12 (2 br s, 2H, Benzyl- CH_2 , überlagert), 6.68-6.70 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 6.79-6.82 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.30 (dd, 1H, $J = 8.7/1.9$ Hz, ArH), 7.32-7.34 (m, 1H, ArH), 7.39-7.43 (m, 2H, ArH), 7.62 (dd, 1H, $J = 8.3/0.8$ Hz, ArH), 7.65 (dd, 1H, $J = 7.7/1.7$ Hz, ArH), 7.97 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, ArH), 11.94 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.3 (Azepin- CH_2), 51.2 (Benzyl- CH_2); 54.8 (OCH_3); 113.5 (2C), 113.5, 120.6, 124.4, 124.6, 125.1, 127.2, 127.6 (2C), 128.2 (tert. C); 109.3, 111.6, 125.8, 129.5, 133.8, 135.8, 139.0, 157.8, 170.0 (quart. C; ein quartäres C nicht detektiert bei 512 Scans); $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_2$ [447.32]; ber. C 64.44, H 4.28, N 6.26; gef. C 64.77, H 4.44, N 5.77; MS (EI): m/z (%) = 446 (100) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 446.0630; gef. 446.0633; HPLC: 97.3% bei 254 nm und 96.6% bei 280 nm, $t_s = 4.19$ min, $t_m = 1.02$ min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 229, 316 nm.

9-Brom-5-(4-chlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**5j**)

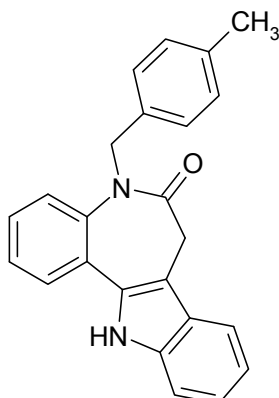
Nach AAV 2 aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**) (164 mg, 0.500 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und 4-Chlorbenzylbromid (103 mg, 0.500 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 49 mg (22%) ockerfarbene Kristalle.

Schmp.: 243 °C; IR (KBr): 3284 cm⁻¹ (NH), 1641 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.20 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H₂O-Signal), 4.01 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.08 (br s, 2H, Benzyl-CH₂), 6.90-6.92 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.18-7.22 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.29-7.36 (m, 2H, ArH), 7.39-7.44 (m, 2H, ArH), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.1 Hz, ArH), 7.67 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.6 Hz, ArH), 7.96 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 11.92 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.3 (Azepin-CH₂), 51.4 (Benzyl-CH₂); 113.6, 120.7, 124.4, 124.7, 125.4, 127.3, 128.1 (2C), 128.4 (2C), 128.4 (tert. C); 109.3, 111.8, 125.8, 127.7, 131.2, 133.8, 136.0, 136.8, 139.0, 170.1 (quart. C); C₂₃H₁₆BrClN₂O [451.74]; ber. C 61.15, H 3.57, N 6.20; gef. C 58.66, H 3.88, N 5.29; MS (EI): *m/z* (%) = 450 (91) [M]⁺; HRMS: ber. 450.0134; gef. 450.0128; HPLC: 96.7% bei 254 nm und 95.8% bei 280 nm, *t*_s = 2.70 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 226, 316 nm.

9-Brom-5-(3,4-dichlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (5k)

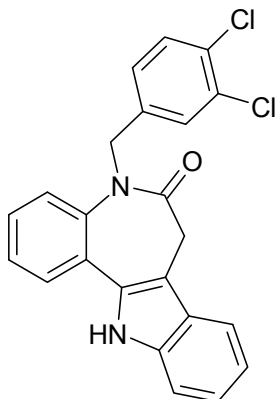
Nach AAV 2 aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**3a**) (164 mg, 0.500 mmol), Natriumhydrid-Suspension (60% in Mineralöl) (20 mg, 0.50 mmol) und 3,4-Dichlorbenzylbromid (120 mg, 0.500 mmol). Reaktionsdauer: 5.5 h. Nach Säulenchromatographie erhält man 60 mg (25%) eines beigen Pulvers.

Schmp.: 251 °C; IR (KBr): 3166 cm^{-1} (NH), 1636 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 3.18 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H_2O -Signal), 4.04 (br s, 1H, Azepin-CH), 4.97 und 5.17 (2 br s, 2H, Benzyl- CH_2 , überlagert), 6.90 (dd, 1H, $J = 8.3/2.1$ Hz, ArH), 7.01 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 7.31 (dd, 1H, $J = 8.5/2.0$ Hz, ArH), 7.35-7.38 (m, 1H, ArH), 7.42-7.45 (m, 3H, ArH), 7.57 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.69 (dd, 1H, $J = 7.7/1.5$ Hz, ArH), 7.99 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 12.00 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.2 (Azepin- CH_2), 51.0 (Benzyl- CH_2); 113.6, 120.7, 124.4, 124.7, 125.5, 126.7, 127.3, 128.1, 128.5, 130.3 (tert. C); 109.2, 111.7, 125.8, 127.6, 130.8, 133.7, 136.0, 138.8, 139.0, 170.2 (quart. C, ein quartäres C nicht detektiert bei 512 Scans); $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{BrCl}_2\text{N}_2\text{O}$ [486.19]; ber. C 56.82, H 3.11, N 5.76; gef. C 56.59, H 3.22, N 5.21; MS (EI): m/z (%) = 484 (96) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 483.9745; gef. 483.9747; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, $t_s = 3.60$ min, $t_m = 1.03$ min (ACN/ H_2O ; 70:30), λ_{max} : 226, 316 nm.

5-(4-Methylbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (5I)

Nach AAV 2 aus 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3c**) (248 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und 4-Methylbenzylbromid (93 mg, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 3.5 h. Man erhält nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol 47 mg (26%) gelbe Kristalle.

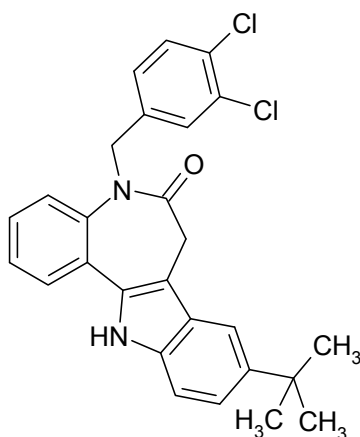
Schmp.: 228-229 °C; IR (KBr): 3229 cm⁻¹ (NH), 3058 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2919 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1640 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.17 (s, 3H, CH₃), 3.14 (br s, 1H, Azepin-CH), 3.97 (br s, 1H, Azepin-CH), 4.96 und 5.12 (2 br s, 2H, Benzyl-CH₂, überlagert), 6.78-6.79 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 6.93-6.95 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.09-7.11 (m, 1H, ArH), 7.18-7.21 (m, 1H, ArH), 7.30-7.33 (m, 1H, ArH), 7.36-7.38 (m, 1H, ArH), 7.46 (dd, 1H, *J* = 8.1/0.8 Hz, ArH), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8.3/0.8 Hz, ArH), 7.67 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.7 Hz, ArH), 7.71 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, ArH) 11.72 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 19.4 (CH₃); 30.5 (Azepin-CH₂), 50.5 (Benzyl-CH₂); 110.5, 117.1, 118.0, 121.1, 123.1, 124.0, 125.2 (2C), 126.0, 126.7, 127.6 (2C) (tert. C); 108.6, 124.8, 125.1, 131.2, 133.6, 134.5, 136.2, 137.8, 169.0 (quart. C); C₂₄H₂₀N₂O [352.43]; ber. C 81.79, H 5.72, N 7.95; gef. C 81.14, H 6.02, N 7.82; MS (EI): *m/z* (%) = 352 (74) [M]⁺; HRMS: ber. 352.1575; gef. 352.1565; HPLC: 98.6% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm, *t*_s = 2.28 min, *t*_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 65:35), λ_{max}: 225, 310 nm.

5-(3,4-Dichlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (5m)

Nach AAV 2 aus 7,12-Dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**3c**) (248 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und 3,4-Dichlorbenzylbromid (86 µl, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Man erhält nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol 66 mg (32%) gelbe Kristalle.

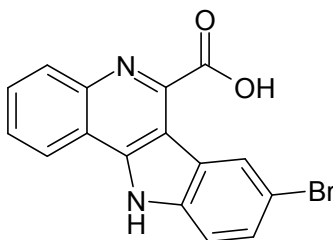
Schmp.: 232-233 °C; IR (KBr): 3252 cm⁻¹ (NH), 3055 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1634 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.21 (br s, 1H, Azepin-CH, überlagert durch H₂O-Signal), 3.96 (br s, 1H, Azepin-CH), 5.07 (br s, 2H, Benzyl-CH₂), 6.90 (dd, 1H, *J* = 8.3/2.3 Hz, ArH), 7.03 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 7.08-7.12 (m, 1H, ArH), 7.18-7.22 (m, 1H, ArH), 7.33-7.43 (m, 3H, ArH), 7.46-7.49 (m, 1H, ArH), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.3 Hz, ArH), 7.68-7.73 (m, 2H, ArH), 11.75 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.4 (Azepin-CH₂), 51.0 (Benzyl-CH₂); 111.6, 118.2, 119.1, 122.3, 124.3, 125.4, 126.7, 127.1, 128.0, 128.2, 130.3 (tert. C); 109.6, 125.8, 126.2, 129.0, 130.8, 132.1, 137.3, 138.5, 139.1, 170.3 (quart. C); C₂₃H₁₆Cl₂N₂O [407.29]; ber. C 67.83, H 3.96, N 6.88; gef. C 67.66, H 4.06, N 7.01; HPLC: 99.7% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, *t*_s = 4.89 min, *t*_m = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 224, 310 nm.

9-*tert*-Butyl-5-(3,4-dichlorbenzyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on
(5n)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3d**) (248 mg, 1.00 mmol), Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl (60%) (20 mg, 0.50 mmol) und 3,4-Dichlorbenzylbromid (86 μ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Man erhält nach Säulenchromatographie und Umkristallisation aus 70%igem Ethanol 36 mg (16%) gelbes Pulver.

Schmp.: 221-222 °C; IR (KBr): 3241 cm^{-1} (NH), 2960 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1637 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, 3x CH_3), 3.15 (br s, 1H, Azepin-CH), 4.01 (br s, 1H, Azepin-CH), 4.97 und 5.21 (2 br s, 2H, Benzyl- CH_2 , überlagert), 6.89 (dd, 1H, $J = 8.3/2.1$ Hz, ArH), 7.05 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 7.30 (dd, 1H, $J = 8.7/1.9$ Hz, ArH), 7.34 (dt, 1H, $J = 7.5/1.0$ Hz, ArH), 7.37-7.42 (m, 3H, ArH), 7.57 (dd, 1H, $J = 8.2/0.8$ Hz, ArH), 7.65-7.68 (m, 2H, ArH), 11.62 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.8 (Azepin- CH_2), 31.1 (3C (CH_3)), 33.7 (C(CH_3) $_3$), 50.2 (Benzyl- CH_2); 110.6, 113.0, 120.1, 123.7, 124.8, 126.1, 126.5, 127.2, 127.7, 129.7 (tert. C); 109.3, 125.0, 125.9, 128.5, 130.2, 131.6, 135.0, 137.7, 138.5, 141.0, 169.8 (quart. C); $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ [463.40]; ber. C 69.98, H 5.22, N 6.05; gef. C 66.32, H 5.10, N 5.92; MS (EI): m/z (%) = 462 (95) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 462.1266; gef. 462.1255; HPLC: 99.2% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, $t_s = 5.84$ min, $t_m = 1.02$ min (ACN/ H_2O ; 70:30), λ_{max} : 313 nm.

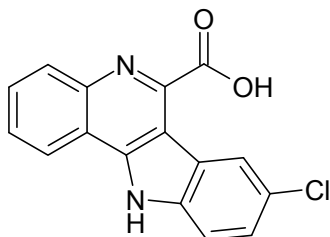
8-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22a**)

Nach AAV 3, Methode A, aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**) (164 mg, 0.500 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (23 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 4 Tage. Man erhält 31 mg (18%) eines hellgelben Pulvers.

Nach AAV 3, Methode B, aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**) (164 mg, 0.500 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (23 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 4 Tage. Man erhält 57 mg (33%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 375-385°C (unter Zersetzung) (Lit.⁶⁵: > 330 °C); HPLC: 98.9% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, t_s = 2.96 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 40:60), λ_{max} : 294, 362 nm.

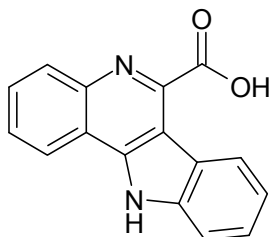
8-Chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22b**)



Nach AAV 3, Methode A, aus 9-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3b**) (142 mg, 0.500 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (23 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Man erhält 48 mg (32%) eines hellgelben Pulvers.

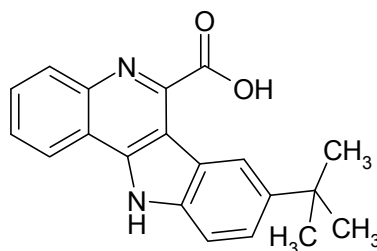
Nach AAV 3, Methode B, aus 9-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3b**) (142 mg, 0.500 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (23 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Man erhält 89 mg (60%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 368-373°C (unter Zersetzung) (Lit.³³: 373 °C); HPLC: 99.9% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, t_s = 2.44 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 40:60), λ_{max} : 221, 296 nm.

11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22c**)

Nach AAV 3, Methode A, aus 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3c**) (248 mg, 1.00 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (326 mg, 2.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (44 mg, 0.25 mmol). Reaktionszeit: 7 Tage. Man erhält 101 mg (39%) eines hellgelben Pulvers.

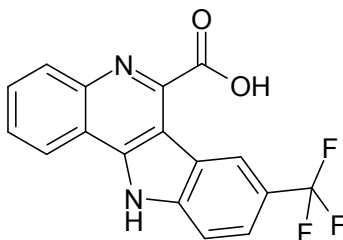
Schmp.: 346-347 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3191 cm⁻¹ (NH), 1655 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.29-7.34 (m, 1H, ArH), 7.41-7.43 (m, 2H, ArH), 7.56-7.65 (m, 3H, ArH), 8.24 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.3 Hz, ArH), 8.35 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 11.54 (s, 1H, NH), 12.71 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 111.8, 121.4, 121.8, 122.5, 123.7, 125.2, 126.9, 130.9 (tert. C); 114.1, 117.0, 126.8, 135.3, 137.0, 141.4, 161.3, 175.1 (quart. C); C₁₆H₁₀N₂O₂ [262.26]; ber. C 73.27, H 3.84, N 10.68; gef. C 73.31, H 3.97, N 10.31; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, *t*_s = 3.27 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + TFA; 30:70), λ_{max}: 240, 294 nm.

8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22d**)

Nach AAV 3, Methode A, aus 9-*tert*-Butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3d**) (305 mg, 1.00 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (23 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 6 Tage. Man erhält 109 mg (34%) eines hellgelben Pulvers.

Nach AAV 3, Methode B, aus 9-*tert*-Butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3d**) (152 mg, 0.500 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (23 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Man erhält 43 mg (27%) eines hellgelben Pulvers.

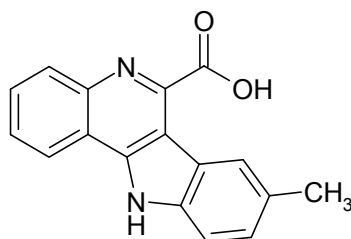
Schmp.: 362-363 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3192 cm⁻¹ (NH), 2958 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1620 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H, 3x CH₃), 7.39 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, ArH), 7.49-7.63 (m, 4H, ArH), 8.21 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 8.38 (s, 1H, ArH), 11.50 (s, 1H, NH), 12.61 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.6 (3C) (CH₃); 34.5 (C(CH₃)₃); 111.3, 117.5, 121.4, 123.4, 123.7, 126.9, 130.7 (tert. C); 117.2, 126.7, 135.2, 135.3, 141.5, 145.2, 161.5, 175.3 (quart. C, ein quartäres C nicht detektiert bei 1920 Scans); C₂₀H₁₈N₂O₂ [318.37]; ber. C 75.45, H 5.70, N 8.80, gef. C 75.50, H 5.81, N 8.48; MS (EI): *m/z* (%) = 318 (22) [M]⁺; HRMS: ber. 318.1368; gef. 318.1376; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, *t*_s = 3.90 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 45:55), λ_{max}: 241, 297 nm.

8-Trifluormethyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22e**)

Nach AAV 3, Methode A, aus 9-Trifluormethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3e**) (253 mg, 0.800 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (261 mg, 1.60 mmol) und Cobalt(II)acetat (35 mg, 0.20 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Man erhält 130 mg (49%) eines hellgelben Pulvers.

Nach AAV 3, Methode B, aus 9-Trifluormethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3e**) (190 mg, 0.600 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (196 mg, 1.20 mmol) und Cobalt(II)acetat (27 mg, 0.15 mmol). Reaktionszeit: 4 Tage. Man erhält 113 mg (59%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 355-365 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3194 cm⁻¹ (NH), 1621 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.41-7.44 (m, 1H, ArH), 7.60-7.67 (m, 2H, ArH), 7.71 (dd, 1H, *J* = 8.4/1.9 Hz, ArH), 7.79 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 8.25 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 11.62 (s, 1H, NH), 13.05 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.7, 117.7 (q, ³*J*_{C,F} = 4.2 Hz, C-C-CF₃), 120.2, 120.4 (q, ³*J*_{C,F} = 3.3 Hz, C-C-CF₃), 122.5, 130.3, 134.6 (tert. C); 111.5, 115.2, 121.7 (q, ²*J*_{C,F} = 32 Hz, C-CF₃), 123.8 (q, ¹*J*_{C,F} = 271 Hz, CF₃), 125.2, 125.8, 137.5, 142.1, 159.6, 174.0 (quart. C); C₁₇H₉F₃N₂O₂ [330.26]; ber. C 61.82, H 2.75, N 8.48, gef. C 61.52, H 2.70, N 8.00; MS (EI): *m/z* (%) = 330 (21) [M]⁺; HRMS: ber. 330.0616; gef. 330.0614; HPLC: 99.2% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*_s = 2.00 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + TFA; 45:55), λ_{max}: 225, 292 nm.

8-Methyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22f**)

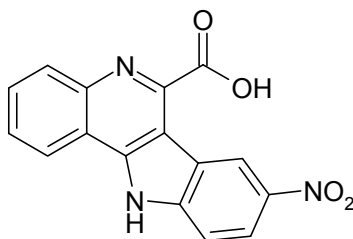
Nach AAV 3, Methode A, aus 9-Methyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3f**) (262 mg, 1.00 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (326 mg, 2.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (44 mg, 0.25 mmol). Reaktionszeit: 8 h.

Die Verbindung zeigte im HPLC-Chromatogramm eine Verunreinigung von etwa 20%, deren Retentionszeit 4 Minuten von der von **22f** abwich. Für die Lösung dieses Trennproblems bot sich die präparative HPLC an. Problematisch dabei war die allgemeine Schwerlöslichkeit der Verbindungsklasse **22** in organischen Lösungsmitteln. Für effektives Arbeiten an der präparativen HPLC sollten sich ca. 50 mg Analysesubstanz in 1 ml DMSO lösen lassen. Von Verbindung **22f** ließen sich nur 10 mg in 1 ml DMSO unter längerem Erwärmen lösen. Nach Einspritzen dieser Lösung in die HPLC-Anlage konnte keine Substanz von der Säule eluiert werden. Auch die säulenchromatographische Trennung unter Normaldruck war bei dieser Verbindung nicht erfolgreich. Die Verbindung ließ sich mit Ethanol/1% Ameisensäure nicht eluieren. Umkristallisationsversuche aus Ethanol und DMF scheiterten. Nach Umkristallisation aus Pyridin und anschließender Heißfiltration wurden 35 mg (13%) eines hellgelben Pulvers isoliert.

Schmp.: 375-380 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3223 cm⁻¹ (NH), 1618 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.46 (s, 3H, CH₃), 7.23 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.7 Hz, ArH), 7.38-7.40 (m, 1H, ArH), 7.50 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.55-7.58 (m, 1H, ArH), 7.62 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.1 Hz, ArH), 8.16 (s, 1H, ArH), 8.21 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.1 Hz, ArH), 11.53 (s, 1H, NH), 12.63 (br s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.3 (CH₃); 111.4, 121.4, 121.5, 123.6, 126.7, 126.9, 130.7 (tert. C); 113.9, 117.0, 127.1, 131.5, 135.2, 135.3, 141.3, 161.4, 175.0 (quart. C); C₁₇H₁₂N₂O₂ [276.29]; ber. C 73.90, H 4.38, N 10.14; gef. C 72.46, H 4.32, N 9.73; MS (EI): *m/z*

(%) = 276 (42) $[M]^+$; HRMS: ber. 276.0899; gef. 276.0890; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, t_s = 2.13 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 40:60), λ_{\max} : 241, 296 nm.

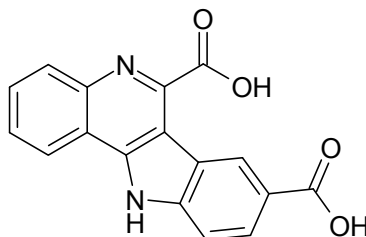
8-Nitro-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22h**)



Nach AAV 3, Methode A, aus 9-Nitro-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3h**, Alsterpaullon) (117 mg, 0.400 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (131 mg, 0.800 mmol) und Cobalt(II)acetat (18 mg, 0.10 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Man erhält 65 mg (53%) eines gelben Pulvers.

Bei der Synthese dieser Verbindung löste sich das Edukt Alsterpaullon (**3h**) sehr schlecht in DMF. Daher wurde bei diesem Ansatz ein größeres Lösungsmittelvolumen von 25 ml verwendet. In diesem Volumen ließen sich 0.4 mmol Alsterpaullon (**3h**) problemlos lösen. Die entstandene Chinolincarbonsäure **22h** fiel nach der Reaktion aus und konnte durch Filtration einfach abgetrennt werden.

Schmp.: 390-400 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3196 cm⁻¹ (NH), 1666 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.43-7.45 (m, 1H, ArH), 7.62-7.67 (m, 2H, ArH), 7.77 (d, 1H, J = 8.9 Hz, ArH), 8.26-8.29 (m, 2H, ArH), 9.20 (dd, 1H, J = 2.3/0.4 Hz, ArH), 11.68 (s, 1H, NH), 13.28 (br s, 1H, COOH); ¹³C-NMR: (konnte nicht aufgenommen werden, da die Substanz in DMSO zu schlecht löslich war); C₁₆H₉N₃O₄ [307.26]; ber. C 62.54, H 2.95, N 13.68; gef. C 62.07, H 3.03, N 13.08; MS (EI): m/z (%) = 307 (34) $[M]^+$; HRMS: ber. 307.0593; gef. 307.0597; HPLC: 98.5% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, t_s = 1.74 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O + TFA; 40:60), λ_{\max} : 245, 285 nm.

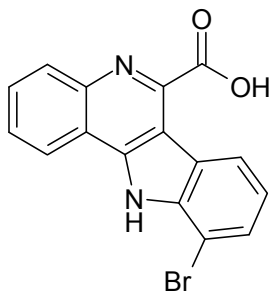
11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6,8-dicarbonsäure (**22i**)

Nach AAV 3, Methode A, aus 6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonsäure (**3i**) (438 mg, 1.50 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (489 mg, 3.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (67 mg, 0.38 mmol). Reaktionszeit: 4 Tage. Man erhält nach Aufkochen in Ethanol 150 mg (33%) eines hellgelben Pulvers.

Nach AAV 3, Methode B, aus 6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonsäure (**3i**) (204 mg, 0.700 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (228 mg, 1.40 mmol) und Cobalt(II)acetat (32 mg, 0.18 mmol). Reaktionszeit: 4 Tage. Man erhält 99 mg (46%) eines hellgelben Pulvers.

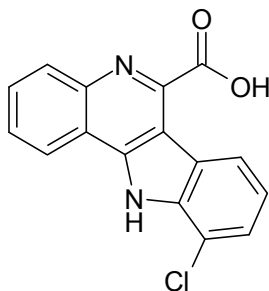
Schmp.: 360-375°C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3153 cm⁻¹ (NH), 1669 und 1652 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.41-7.44 (m, 1H, ArH), 7.59-7.68 (m, 3H, ArH), 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.6 Hz, ArH), 8.24 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 9.00 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz, ArH), 11.64 (s, 1H, NH), 12.83 (br s, 1H, COOH), 12.98 (br s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 111.5, 121.3, 123.6, 124.0, 126.3, 126.9, 131.2 (tert. C); 114.2, 116.6, 124.7, 126.2, 135.5, 139.5, 142.8, 161.0, 167.6, 175.1 (quart. C); C₁₇H₁₀N₂O₄ [306.27]; ber. C 66.67, H 3.29, N 9.15; gef. C 65.79, H 3.33, N 8.87; MS (EI): *m/z* (%) = 306 (30) [M]⁺; HRMS: ber. 306.0641; gef. 306.0640; HPLC: 97.3% bei 254 nm und 98.2% bei 280 nm, *t*_s = 2.51 min, *t*_m = 1.05 min (ACN/H₂O + TFA; 25:75), λ_{max}: 241, 296, 306 nm.

10-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22j**)



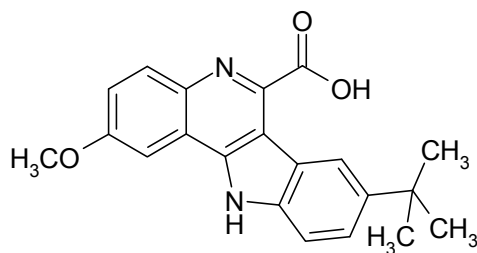
Nach AAV 3, Methode A, aus 11-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3j**) (131 mg, 0.400 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (131 mg, 0.800 mmol) und Cobalt(II)acetat (18 mg, 0.10 mmol). Reaktionszeit: 4 Tage. Man erhält 26 mg (19%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 347 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3271 cm⁻¹ (NH), 1672 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.25 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.36-7.40 (m, 1H, ArH), 7.58 (d, 2H, *J* = 3.8 Hz, ArH), 7.62 (dd, 1H, *J* = 7.7/0.9 Hz, ArH), 8.29 (dd, 1H, *J* = 8.0/0.9 Hz, ArH), 8.43 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 11.54 (s, 1H, NH), 12.29 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 120.7, 121.2, 123.4, 124.0, 128.1, 128.9, 131.1 (tert. C); 104.1, 115.2, 117.1, 128.3, 135.2, 135.8, 142.7, 161.6, 176.0 (quart. C); C₁₆H₉BrN₂O₂ [341.16]; ber. C 56.33, H 2.66, N 8.21; gef. C 56.68, H 2.68, N 7.82; HPLC: 95.4% bei 254 nm und 96.1% bei 280 nm, *t*_s = 3.04 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + TFA; 40:60), λ_{max}: 239, 292 nm.

10-Chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22k**)

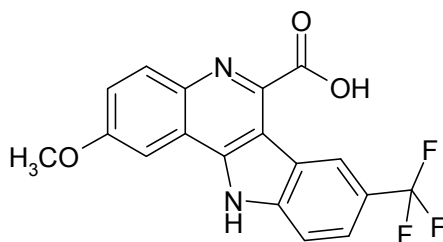
Nach AAV 3, Methode A, aus 11-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3k**) (156 mg, 0.550 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (180 mg, 1.10 mmol) und Cobalt(II)acetat (25 mg, 0.14 mmol). Reaktionszeit: 5 Tage. Man erhält 76 mg (47%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 350 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3254 cm⁻¹ (NH), 1672 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.31 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.37-7.40 (m, 1H, ArH), 7.47 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.58-7.61 (m, 2H, ArH), 8.26 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 8.45 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 11.55 (s, 1H, NH), 12.49 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 120.3, 121.3, 123.4, 123.6, 124.9, 128.6, 131.2 (tert. C); 115.1, 116.1, 117.0, 128.5, 134.1, 135.3, 142.7, 161.5, 175.9 (quart. C); C₁₆H₉ClN₂O₂ [296.71]; ber. C 64.77, H 3.06, N 9.44; gef. C 64.40, H 3.14, N 9.12; HPLC: 93.6% bei 254 nm und 94.8% bei 280 nm, *t*_s = 2.75 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + TFA; 40:60), λ_{max}: 293, 362 nm.

8-*tert*-Butyl-2-methoxy-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (22I)

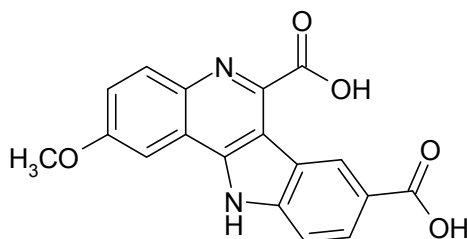
Nach AAV 3, Methode A, aus 9-*tert*-Butyl-2-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepin-6(5*H*)-on (**3I**) (334 mg, 1.00 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (326 mg, 2.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (53 mg, 0.30 mmol). Reaktionszeit: 4 Tage. Man erhält nach Aufkochen in Ethanol 65 mg (19%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 360-370 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3177 cm⁻¹ (NH), 2959 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H, 3x CH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.21 (dd, 1H, *J* = 8.8/1.7 Hz, ArH), 7.51-7.56 (m, 3H, ArH), 7.69 (s, 1H, ArH), 8.38 (s, 1H, ArH), 11.44 (s, 1H, NH), 12.61 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (3C) (CH₃); 34.5 (C(CH₃)₃); 55.7 (OCH₃); 109.5, 111.2, 117.5, 118.5, 123.0, 123.5 (tert. C); 114.5, 117.9, 126.7, 129.1, 135.1, 141.1, 145.1, 155.2, 161.0, 175.5 (quart. C); C₂₁H₂₀N₂O₃ [348.40]; ber. C 72.40, H 5.79, N 8.04; gef. C 71.22, H 5.76, N 7.57; MS (EI): *m/z* (%) = 348 (19) [M]⁺; HRMS: ber. 348.1474; gef. 348.1469; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, *t*_s = 1.91 min, *t*_m = 1.02 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 55:45), λ_{max}: 225, 296 nm.

2-Methoxy-8-(trifluormethyl)-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22n**)

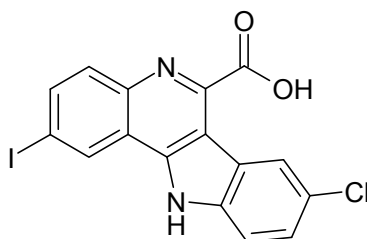
Nach AAV 3, Methode B, aus 2-Methoxy-9-trifluormethyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3n**) (346 mg, 1.00 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (326 mg, 2.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (44 mg, 0.25 mmol). Reaktionszeit: 2 Tage. Nach Aufkochen in 70%igem Ethanol erhält man 124 mg (34%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 365-375 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3274 cm⁻¹ (NH), 3066 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2954 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1665 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 3.93 (s, 3H, OCH₃), 7.26 (dd, 1H, *J* = 9.0/2.8 Hz, ArH), 7.59 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, ArH), 7.72-7.73 (m, 2H, ArH), 7.80 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 8.67 (s, 1H, ArH), 11.52 (s, 1H, NH), 13.02 (br s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.8 (OCH₃); 109.7, 112.7, 119.1 (q, ³*J*_{C,F} = 4.2 Hz, C-C-CF₃), 119.3, 121.7 (q, ³*J*_{C,F} = 3.3 Hz, C-C-CF₃), 123.1 (tert. C); 114.2, 117.3, 123.0 (q, ²*J*_{C,F} = 31 Hz, C-CF₃), 125.0 (q, ¹*J*_{C,F} = 271 Hz, CF₃), 126.5, 129.8, 138.8, 143.1, 155.3, 160.5, 175.5 (quart. C); C₁₈H₁₁F₃N₂O₂ [360.29]; ber. C 60.01, H 3.08, N 7.78; gef. C 59.84, H 3.03, N 7.46; MS (EI): *m/z* (%) = 360 (53) [*M*]⁺; HRMS: ber. 360.0722; gef. 360.0717; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*_s = 2.80 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 45:55), λ_{max}: 231, 293 nm.

2-Methoxy-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6,8-dicarbonsäure (**22o**)

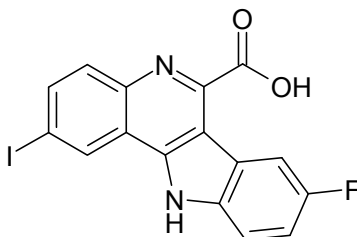
Nach AAV 3, Methode B, aus 2-Methoxy-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepin-9-carbonsäure (**3o**) (322 mg, 1.00 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (326 mg, 2.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (44 mg, 0.25 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Nach Aufkochen in Ethanol erhält man 190 mg (57%) eines orangen Pulvers.

Schmp.: 350-365 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3162 cm⁻¹ (NH), 1675 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.92 (s, 3H, OCH₃), 7.25 (d, 1H, *J* = 6.4 Hz, ArH), 7.58 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, ArH), 7.67-7.71 (m, 2H, ArH), 8.00 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz, ArH), 9.00 (s, 1H, ArH), 11.54 (s, 1H, NH), 12.84 und 12.92 (2 br s, 2H, COOH, überlagert); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.8 (OCH₃); 109.7, 111.6, 119.0, 123.1, 124.9, 126.4 (tert. C); 114.6, 117.5, 124.3, 126.5, 129.6, 139.5, 142.5, 155.3, 160.7, 167.8, 175.5 (quart. C); C₁₈H₁₂N₂O₅ [336.30]; ber. C 64.29, H 3.60, N 8.33, gef. C 63.72, H 3.52, N 8.03; MS (EI): *m/z* (%) = 336 (28) [M]⁺; HRMS: ber. 360.0722; gef. 360.0717; HPLC: 98.0% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, *t*_s = 4.72 min, *t*_m = 1.04 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 25:75), λ_{max}: 245, 304 nm.

8-Chlor-2-iod-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22p**)

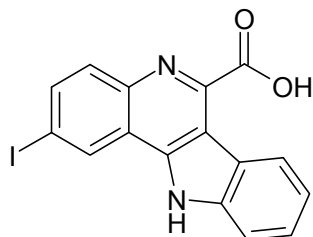
Nach AAV 3, Methode A, aus 9-Chlor-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3p**) (135 mg, 0.330 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (108 mg, 0.660 mmol) und Cobalt(II)acetat (15 mg, 0.08 mmol). Reaktionszeit: 6 Tage. Man erhält 87 mg (62%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 365-370 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3263 cm⁻¹ (NH), 1670 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.38-7.43 (m, 2H, ArH), 7.59 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.86 (dd, 1H, *J* = 8.7/1.9 Hz, ArH), 8.30 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.52 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 11.60 (s, 1H, NH), 12.87 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.9, 120.2, 122.6, 124.7, 134.6, 138.5 (tert. C); 87.0, 112.7, 118.0, 126.4, 127.2, 133.9, 134.8, 140.2, 160.1, 174.0 (quart. C); C₁₆H₈ClIN₂O₂ [422.60]; ber. C 45.47, H 1.91, N 6.63; gef. C 45.68, H 2.51, N 7.30; MS (EI): *m/z* (%) = 422 (36) [M]⁺; HRMS: ber. 421.9320; gef. 421.9314; HPLC: 98.6% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, *t*_s = 5.00 min, *t*_m = 1.02 min (ACN/H₂O + TFA; 45:55), λ_{max}: 234, 296 nm.

8-Fluor-2-iod-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22q**)

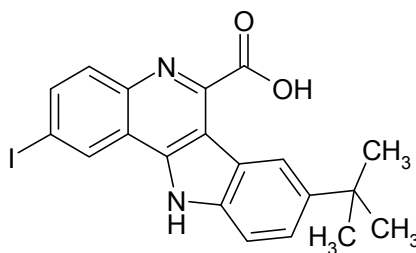
Nach AAV 3, Methode B, aus 9-Fluor-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3q**) (196 mg, 0.500 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (23 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 2 Tage. Man erhält 138 mg (68%) eines kräftig gelben Pulvers.

Schmp.: 365-380 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3243 cm⁻¹ (NH), 3066 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 7.28 (dt, 1H, *J* = 9.1/2.8 Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.60 (dd, 1H, *J* = 8.8/4.6 Hz, ArH), 7.87 (dd, 1H, *J* = 8.7/1.9 Hz, ArH), 8.02 (dd, 1H, *J* = 9.7/2.7 Hz, ArH), 8.55 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 11.57 (s, 1H, NH), 12.83 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 106.8 (d, ²*J*_{C,F} = 25 Hz), 113.2 (d, ³*J*_{C,F} = 10 Hz), 113.6 (d, ²*J*_{C,F} = 26 Hz), 123.4, 134.6, 139.1 (tert. C); 87.4, 114.3 (d, ⁴*J*_{C,F} = 4 Hz), 119.0, 127.4 (d, ³*J*_{C,F} = 11 Hz), 133.7, 135.2, 141.0, 160.8, 161.1 (d, ¹*J*_{C,F} = 222 Hz), 174.8 (quart. C); C₁₆H₈FIN₂O₂ [406.15]; ber. C 47.32, H 1.99, N 6.90; gef. C 47.27, H 1.93, N 6.63; MS (EI): *m/z* (%) = 406 (50) [M]⁺; HRMS: ber. 405.9615; gef. 405.9606; HPLC: 98.7% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, *t*_s = 5.85 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 40:60), λ_{max}: 231, 245, 295 nm.

2-Iod-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**22r**)

Nach AAV 3, Methode B, aus 2-Iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3r**) (150 mg, 0.400 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (130 mg, 0.800 mmol) und Cobalt(II)acetat (18 mg, 0.10 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Nach Aufkochen in Ethanol erhält man 62 mg (40%) eines gelben Pulvers.

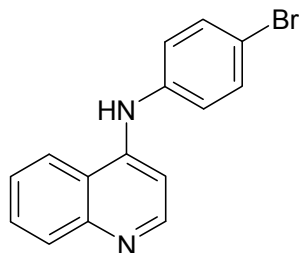
Schmp.: 365 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3271 cm⁻¹ (NH), 3093 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1666 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.31-7.33 (m, 1H, ArH), 7.39-7.44 (m, 2H, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.87 (dd, 1H, *J* = 8.6/2.0 Hz, ArH), 8.34 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 8.58 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 11.63 (s, 1H, NH), 12.78 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 111.9, 121.9, 122.7, 123.4, 125.5, 134.7, 138.9 (tert. C); 87.5, 114.5, 119.2, 126.7, 135.0, 137.1, 139.7, 161.2, 175.0 (quart. C); C₁₆H₉IN₂O₂ [388.16]; ber. C 49.51, H 2.34, N 7.22; gef. C 49.58, H 2.24, N 6.73; MS (EI): *m/z* (%) = 388 (39) [M]⁺; HRMS: ber. 387.9709; gef. 387.9704; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, *t*_s = 2.57 min, *t*_m = 1.02 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 45:55), λ_{max}: 247, 296 nm.

8-*tert*-Butyl-2-iod-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (22s)

Nach AAV 3, Methode A, aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3s**) (215 mg, 0.500 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (163 mg, 1.00 mmol) und Cobalt(II)acetat (22 mg, 0.13 mmol). Reaktionszeit: 3 Tage. Man erhält 44 mg (20%) eines orange-gelben Pulvers.

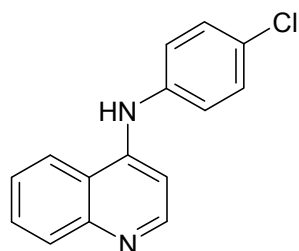
Nach AAV 3, Methode B, aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3s**) (387 mg, 0.900 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (293 mg, 1.80 mmol) und Cobalt(II)acetat (40 mg, 0.23 mmol). Reaktionszeit: 5 Tage. Nach Aufkochen in Ethanol erhält man 170 mg (43%) eines orange-gelben Pulvers.

Schmp.: 358-361 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3224 cm⁻¹ (NH), 2951 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1664 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H, 3x CH₃), 7.39 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 7.50-7.55 (m, 2H, ArH), 7.85 (dd, 1H, *J* = 8.6/1.8 Hz, ArH), 8.37 (s, 1H, ArH), 8.55 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 11.54 (s, 1H, NH), 12.65 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.5 (3C) (CH₃); 34.5 (C(CH₃)₃); 111.4, 117.5, 123.3, 123.7, 134.6, 138.7 (tert. C); 87.7, 114.6, 119.3, 126.5, 134.8, 135.3, 139.8, 145.2, 161.3, 175.0 (quart. C); C₂₀H₁₇IN₂O₂ [444.27]; ber. C 54.07, H 3.86, N 6.31; gef. C 54.00, H 3.72, N 6.10; MS (EI): *m/z* (%) = 444 (31) [M]⁺; HRMS: ber. 444.0335; gef. 444.0345; HPLC: 99.5% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm, *t*_s = 4.65 min, *t*_m = 1.04 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 55:45), λ_{max}: 234, 248, 297 nm.

N-(4-Bromphenyl)chinolin-4-amin (28a)

Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Bromanilin (172 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus n-Hexan/Ethanol erhält man 193 mg (65%) eines hellgelben Pulvers.

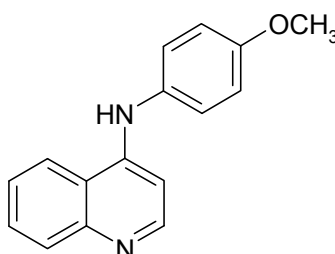
Schmp.: 190 °C; IR (KBr): 3156 cm^{-1} (NH), 3066 cm^{-1} und 3005 cm^{-1} (CH aromatisch); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 7.00 (d, 1H, J = 4.9 Hz, ArH), 7.33-7.35 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.54-7.58 (m, 3H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems und zweites Multiplett überlagert), 7.72 (t, 1H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.90 (d, 1H, J = 8.3 Hz, ArH), 8.36 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 8.50 (d, 1H, J = 4.9 Hz, ArH), 9.06 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 100.7, 120.7, 122.3 (2C), 123.4, 127.8, 128.0, 130.7 (2C), 149.3 (tert. C.); 113.4, 118.5, 138.8, 145.6, 147.5 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrN}_2$ [299.17]; ber. C 60.22, H 3.71, N 9.36; gef. C 59.69, H 3.65, N 9.01.

N-(4-Chlorphenyl)chinolin-4-amin (28b)

Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Chloranilin (128 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus Ethylacetat/Ethanol erhält man 125 mg (49%) hellgelbe Nadeln.

Schmp.: 190 °C; IR (KBr): 3199 cm^{-1} (NH), 3005 cm^{-1} (CH aromatisch); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 6.98 (d, 1H, J = 5.3 Hz, ArH), 7.39-7.40 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.45-7.46 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.54-7.57 (m, 1H, ArH), 7.70-7.73 (m, 1H, ArH), 7.90 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 8.37 (d, 1H, J = 7.7 Hz, ArH), 8.49 (d, 1H, J = 5.3 Hz, ArH), 9.05 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 101.9, 122.0, 123.4 (2C), 124.7, 129.2 (3C), 129.3, 150.6 (tert. C); 119.8, 126.8, 139.7, 147.0, 148.8 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2$ [254.71]; ber. C 70.73, H 4.35, N 11.00; gef. C 68.60, H 4.24, N 10.20.

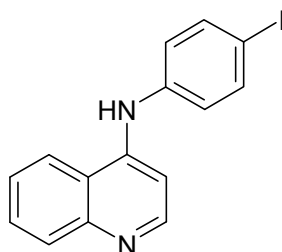
N-(4-Methoxyphenyl)chinolin-4-amin (**28c**)



Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Methoxyanilin (123 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 3.5 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus Dichlormethan erhält man 105 mg (42%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 184 °C (Lit.¹¹⁵: 187-189 °C)

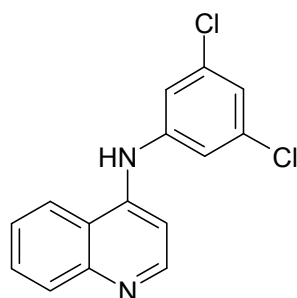
N-(4-Iodphenyl)chinolin-4-amin (**28d**)



Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Iodanilin (219 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 6 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus Ethanol erhält man 80 mg (23%) gelbes Pulver.

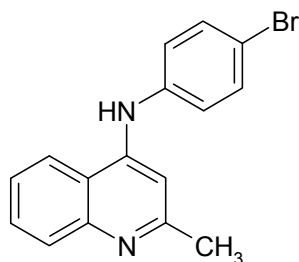
Schmp.: 215 °C; IR (KBr): 3137 cm^{-1} (NH), 3063 cm^{-1} und 3002 cm^{-1} (CH aromatisch); ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.01 (d, 1H, J = 5.3 Hz, ArH), 7.19-7.22 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.53-7.56 (m, 1H, ArH), 7.69-7.73 (m, 3H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems und zweites Multiplett überlagert), 7.90 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 8.35 (d, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 8.49 (d, 1H, J = 5.3 Hz, ArH), 9.00 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 103.3, 123.2, 124.9 (2C), 125.9, 130.3, 130.4, 139.0 (2C), 151.7 (tert. C); 87.6, 121.0, 141.7, 147.9, 150.0 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2$ [346.17]; ber. C 52.04, H 3.20, N 8.09; gef. C 51.23, H 3.08, N 7.58.

N-(3,5-Dichlorphenyl)chinolin-4-amin (**28e**)



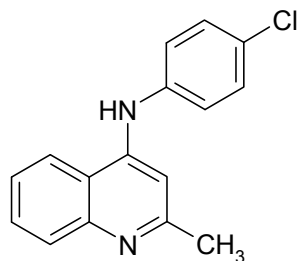
Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 3,5-Dichloranilin (162 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 18 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus Ethanol erhält man 166 mg (57%) weißes Pulver.

Schmp.: 203-209 °C; IR (KBr): 3048 cm^{-1} und 3018 cm^{-1} (CH aromatisch); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.17 (d, 1H, J = 5.1 Hz, ArH), 7.23 (t, 1H, J = 1.8 Hz, ArH), 7.36-7.37 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.57-7.61 (m, 1H, ArH), 7.72-7.77 (m, 1H, ArH), 7.94 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 8.31 (d, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 8.59 (d, 1H, J = 5.1 Hz, ArH), 9.24 (br s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 104.1, 118.4 (2C), 121.5, 122.1, 125.2, 128.9, 129.6, 150.4 (tert. C); 120.3, 134.5 (2C), 144.0, 154.8, 148.6 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_2$ [289.16]; ber. C 62.31, H 3.49, N 9.69; gef. C 59.63, H 3.34, N 8.94.

N-(4-Bromphenyl)-2-methylchinolin-4-amin (28f)

Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinaldin (202 μ l, 1.00 mmol) und 4-Bromanilin (172 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 8.5 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus Cyclohexan/Ethanol erhält man 102 mg (33%) eines gelblich-weißen Pulvers.

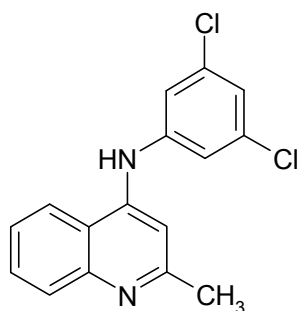
Schmp.: 188-189 °C; IR (KBr): 3160 cm^{-1} und 3058 cm^{-1} (CH aromatisch), 2915 cm^{-1} (CH aliphatisch); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.47 (s, 3H, CH_3), 6.90 (s, 1H, ArH), 7.31-7.33 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.45-7.48 (m, 1H, ArH), 7.55-7.57 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.63-7.68 (m, 1H, ArH), 7.80 (d, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 8.28 (d, 1H, J = 8.3 Hz, ArH), 8.90 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 25.1 (CH_3); 102.1, 121.8, 123.6 (2C), 123.9, 128.4, 129.2, 132.0 (2C) (tert. C); 114.5, 118.5, 140.3, 147.0, 148.6, 158.7 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrN}_2$ [313.19]; ber. C 61.36, H 4.18, N 8.94; gef. C 61.30, H 4.14, N 8.61.

N-(4-Chlorphenyl)-2-methylchinolin-4-amin (28g)

Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinaldin (404 μ l, 2.00 mmol) und 4-Chloranilin (255 mg, 2.00 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus n-Hexan/Ethanol erhält man 104 mg (19%) farblose Kristalle.

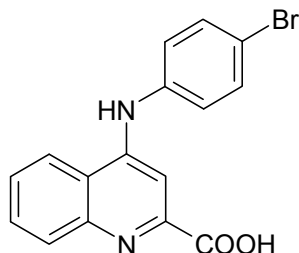
Schmp.: 183-184 °C; IR (KBr): 3143 cm⁻¹ (NH), 3100 cm⁻¹ und 3035 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2917 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.46 (s, 3H, CH₃), 6.89 (s, 1H, ArH), 7.37-7.39 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.44-7.49 (m, 3H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems überlagert durch ein zweites Multiplett), 7.65-7.67 (m, 1H, ArH), 7.80 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 8.29 (dd, 1H, *J* = 8.4/0.9 Hz, ArH), 8.94 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 23.7 (CH₃); 100.6, 120.5, 122.0 (2C), 122.5, 127.0, 127.8 (2C), 127.9 (tert. C.); 117.1, 125.3, 138.5, 145.8, 147.2, 157.4 (quart. C); C₁₆H₁₃ClN₂ [268.74]; ber. C 71.51, H 4.88, N 10.42; gef. C 71.41, H 4.90, N 10.14.

N-(3,5-Dichlorphenyl)-2-methylchinolin-4-amin (**28h**)



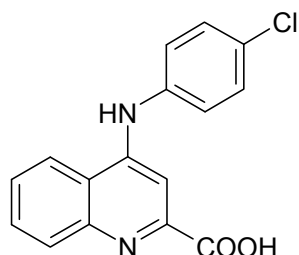
Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinaldin (404 µl, 2.00 mmol) und 4-Chloranilin (255 mg, 2.00 mmol). Reaktionsdauer: 40 h. Nach Alkalisierung und Umkristallisation aus *n*-Hexan/Ethanol erhält man 104 mg (19%) weißes Pulver.

Schmp.: 214-216 °C; IR (KBr): 3236 cm⁻¹ (NH), 3057 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2825 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.54 (s, 3H, CH₃), 7.05 (s, 1H, ArH), 7.26 (t, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 7.37 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 7.52-7.54 (m, 1H, ArH), 7.71-7.74 (m, 1H, ArH), 7.85 (dd, 1H, *J* = 8.5/0.8 Hz, ArH), 8.26 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 9.29 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ (ppm) = 24.5 (CH₃); 104.2, 118.8 (2C), 121.7, 122.2, 124.6, 127.5, 129.9 (tert. C); 118.9, 134.6 (2C), 144.2, 146.8, 147.5, 158.4 (quart. C); C₁₆H₁₂Cl₂N₂ [303.19]; ber. C 63.38, H 3.99, N 9.24; gef. C 61.95, H 3.92, N 8.61.

4-(4-Bromanilino)chinolin-2-carbonsäure (29a)

Nach AAV 5 aus 4-Chlorchinolin-2-carbonsäure (**94**) (118 mg, 0.570 mmol) und 4-Bromanilin (98 mg, 0.57 mmol). Reaktionsdauer: 6.5 h. Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 45 mg (23%) hellgelbe Nadeln.

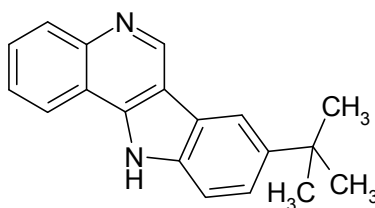
Schmp.: 263 °C; IR (KBr): 3200-2500 cm^{-1} (COOH, „Säurebauch“), 3030 cm^{-1} (CH aromatisch), 1604 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 7.31 (s, 1H, ArH), 7.45-7.46 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.75-7.77 (m, 3H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems und zweites Multiplett überlagert), 7.96 (t, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 8.31 (d, 1H, J = 8.3 Hz, ArH), 8.57 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 10.32 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 99.4, 122.6, 123.3, 126.8, 126.9 (2C), 132.7 (2C), 132.8 (tert. C); 117.8, 118.8, 137.5, 140.2, 150.1, 153.6, 161.2 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_2$ [343.18]; ber. C 56.00, H 3.23, N 8.16; gef. C 55.14, H 3.10, N 7.67; MS (EI): m/z (%) = 342 (16) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 342.0004; gef. 341.9998; HPLC: 100.0% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, t_s = 3.12 min, t_m = 1.03 min (ACN/ H_2O + Ameisensäure; 30:70), λ_{max} : 223, 243, 359 nm.

4-(4-Chloranilino)chinolin-2-carbonsäure (29b)

Nach AAV 5 aus 4-Chlorchinolin-2-carbonsäure (**94**) (104 mg, 0.500 mmol) und 4-Chloranilin (64 mg, 0.50 mmol). Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 62 mg (42%) hellgelbe Nadeln.

Schmp.: 262-263 °C; IR (KBr): 3200-2700 cm⁻¹ (COOH, „Säurebauch“), 3097 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1606 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.29 (s, 1H, ArH), 7.51-7.52 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.63-7.64 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.75 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, ArH), 7.95 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, ArH), 8.32 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 8.57 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 10.36 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 99.3, 122.7, 123.0, 126.73 (2C), 126.78, 129.8 (2C), 132.9 (tert. C); 117.7, 130.6, 137.0, 140.0, 150.1, 153.9, 161.1 (quart. C); C₁₆H₁₁ClN₂O₂ [298.72]; ber. C 64.33, H 3.71, N 9.38; gef. C 61.06, H 3.62, N 8.58; MS (EI): *m/z* (%) = 298 (14) [M]⁺; HRMS: ber. 298.0509; gef. 298.0501; HPLC: 100.0% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, *t*_s = 2.60 min, *t*_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 30:70), λ_{max}: 222, 243, 359 nm.

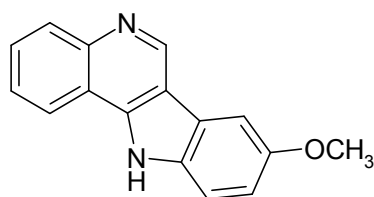
8-*tert*-Butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin (**30a**)



Die Suspension von *N,N*-Bis-(8-*tert*-butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure) (**86c**) (180 mg, 0.280 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (3 ml) wird zum Rückfluss erhitzt. Nach wenigen Minuten entsteht eine klare Lösung. Nach Zugabe von Wasser (20 ml) entsteht ein hellgelber Niederschlag. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (30 ml) mehrmals ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus *n*-Hexan/Ethanol umkristallisiert. Man erhält 60 mg (77%) eines hellgelben Pulvers.

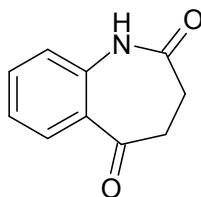
Schmp.: 340-346 °C; IR (KBr): 3434 cm^{-1} (NH), 3027 cm^{-1} (CH aromatisch), 2955 cm^{-1} (CH aliphatisch); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.44 (s, 9H, 3x CH_3), 7.57 (dd, 1H, J = 8.6/1.8 Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, J = 8.6/0.5 Hz, ArH), 7.66-7.76 (m, 2H, ArH), 8.13 (dd, 1H, J = 8.3/1.0 Hz, ArH), 8.34 (d, 1H, J = 1.8 Hz, ArH), 8.51 (dd, 1H, J = 7.9/1.5 Hz, ArH), 9.63 (s, 1H, ArH), 12.59 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (3C) (CH_3); 34.5 (C(CH_3) $_3$); 111.3, 116.0, 122.0, 123.5, 125.5, 127.8, 129.5, 144.8 (tert. C); 114.5, 117.1, 121.7, 136.9, 139.9, 143.2, 145.3 (quart. C); $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2$ [274.36]; ber. C 83.16, H 6.61, N 10.21; gef. C 79.90, H 6.69, N 9.36; MS (EI): m/z (%) = 274 (30) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 274.1470; gef. 274.1464; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, t_s = 5.05 min, t_m = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 65:35), λ_{max} : 236, 276 nm.

8-Methoxy-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin (**30b**)



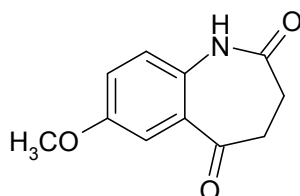
N-(4-Methoxyphenyl)chinolin-4-amin (**28c**) (467 mg, 1.90 mmol) und Palladium(II)-acetat (428 mg, 1.90 mmol) werden in Eisessig (60 ml) gelöst. Die Lösung wird 10 h unter Stickstoff-Atmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach Abbruch der Reaktion wird heiß filtriert. Das Lösungsmittel wird weitgehend im Vakuum abgedampft. Nach Zugabe von Kieselgel (1 g) wird der Rückstand am Rotationsverdampfer bis zur Bildung eines trockenen Pulvers eingeeengt. Nach Säulenchromatographie (Ethylacetat/Methanol 3 + 1) erhält man 42 mg (9%) oranges Pulver.

Schmp.: 280-285 °C (Lit.¹¹⁵: 319-322 °C); MS (EI): m/z (%) = 248 (100) $[\text{M}]^+$; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_s = 2.43 min, t_m = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 233, 282 nm.

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31a**)

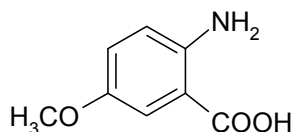
5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**37a**) (2.47 g, 10.0 mmol) wird unter Stickstoff-Atmosphäre in DMSO (30 ml) unter Zusatz von Wasser (0.5 ml) bei 150 °C dealkoxycarbonyliert. Nach 1 h und 3 h wird erneut Wasser (jeweils 0.5 ml) zugesetzt und weiter gerührt. Nach insgesamt 4 h wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend in Wasser (200 ml) gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 1.3 g (74%) farblose Kristalle.

Schmp.: 187-188 °C (Lit.⁶⁸: 188 °C)

7-Methoxy-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**31b**)

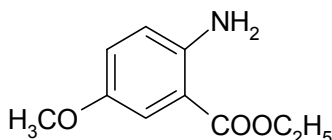
5-Hydroxy-7-methoxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**37b**) (833 mg, 3.00 mmol) wird unter Stickstoff-Atmosphäre in DMSO (9 ml) unter Zusatz von Wasser (0.5 ml) bei 150 °C dealkoxycarbonyliert. Nach 1 h und 3 h wird erneut Wasser (jeweils 0.5 ml) zugesetzt und weiter gerührt. Nach insgesamt 4 h wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend in Wasser (200 ml) gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Man erhält 544 mg (88%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: 180 °C (Lit.⁶⁸: 181 °C)

2-Amino-5-methoxybenzoesäure (33)

5-Methoxy-2-nitrobenzoesäure (2.96 g, 15.0 mmol) wird zu einer Suspension aus Zinn(II)chlorid (14.6 g, 77.0 mmol) in konzentrierter Salzsäure (15 ml) gegeben. Die Suspension wird langsam auf 80 °C erwärmt. Nach 15 min wird konzentrierte Salzsäure (8 ml) zugegeben und die Suspension 20 min im Eisbad gerührt. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit konzentrierter Salzsäure gewaschen und erneut abgesaugt. Unter Rühren wird der Rückstand in 10%iger Natriumcarbonat-Lösung gelöst. Nach Alkalisierung der Lösung mit 20%iger Natronlauge tritt ein feiner, grauer Niederschlag auf, der abfiltriert und verworfen wird. Das gelbliche Filtrat wird vorsichtig mit 10%iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 4 eingestellt und anschließend mehrmals mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Man erhält 1.31 g (52%) eines gelben Pulvers.

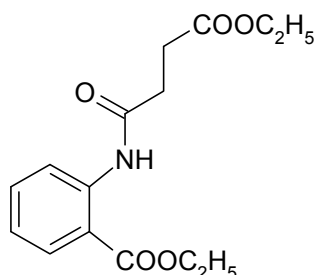
Schmp.: 147 °C (Lit.⁶⁶: 149-152 °C)

2-Amino-5-methoxybenzoesäureethylester(34b)

2-Amino-5-methoxybenzoesäure (33) (2.8 g, 17 mmol) wird in absolutem Ethanol (100 ml) gelöst. In diese Lösung wird 30 min Chlorwasserstoffgas geleitet, bis sich ein deutlicher Bodensatz des Hydrochlorids gebildet hat. Der Ansatz wird 30 min offen unter dem Abzug gerührt, um überschüssiges Chlorwasserstoffgas zu entfernen. Die Suspension wird bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes zum Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt, der verbleibende Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit 5%iger Natriumacetat-Lösung neutra-

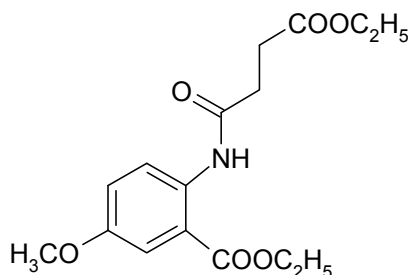
liert. Die wässrige Phase wird mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Das verbleibende gelbliche Öl wird direkt weiter zu **36b** umgesetzt.

2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]benzoesäureethylester (**36a**)



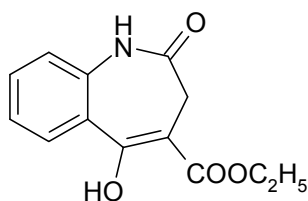
Eine Lösung von Bernsteinsäureethylesterchlorid (10.0 ml, 0.0700 mol) in Toluol (8 ml) wird langsam zu einer gerührten und im Eisbad gekühlten Lösung von Anthranilsäureethylester (8.30 g, 0.0500 mol) in Pyridin (6 ml) und Toluol (22 ml) getropft. Die entstandene Suspension wird bei 80 °C 2 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die organische Phase mit Wasser (7 ml), 10%iger Salzsäure (7 ml) und 5%iger Natriumcarbonat-Lösung (7 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 10.7 g (74%) weiße Kristalle.

Schmp.: 60 °C (Lit.¹⁵⁸: 60°C)

2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-methoxybenzoessäureethylester (**36b**)

Eine Lösung von Bernsteinsäureethylesterchlorid (3.4 ml, 25 mmol) in Toluol (5 ml) wird langsam zu einer gerührten und im Eisbad gekühlten Lösung von 2-Amino-5-methoxybenzoessäureethylester (**34b**) (3.3 g, 17 mmol) in Pyridin (2.5 ml) und Toluol (8 ml) getropft. Die entstandene Suspension wird bei 80 °C 4 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die organische Phase mit Wasser (5 ml), 10%iger Salzsäure (5 ml) und 5%iger Natriumcarbonat-Lösung (5 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 2.43 g (44%) eines hellbräunlichen Feststoffes.

Schmp.: 67 °C (Lit.¹⁵⁶: 68°C)

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**37a**)

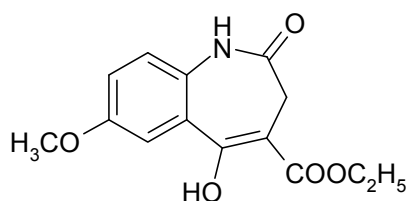
Alle Arbeitsschritte werden unter Stickstoff-Atmosphäre und unter Verwendung eines Metallkühlers durchgeführt. Eine 35%ige Suspension von Kaliumhydrid* in Mineralöl (5.00 g, 0.125 mol) (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) wird dreimal mit getrocknetem Toluol (jeweils 35 ml) gewaschen und anschließend in getrocknetem Toluol (35 ml) suspendiert. 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]benzoessäureethylester (**36a**) (7.30 g, 0.0250 mol) wird in *N,N*-Dimethylformamid (11 ml) und getrocknetem Toluol (75 ml) gelöst und sehr langsam über einen Tropftrichter in die im Silikonbad auf 0-10 °C gekühlte Kalium-

hydridsuspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird der Reaktionsansatz 3 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden sehr vorsichtig Eisessig (15 ml) und Wasser (80 ml) zugegeben. Es bildet sich ein weißer Niederschlag, der abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält 4.6 g (75%) weiße Kristalle.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

Schmp.: 212-213 °C (Lit.⁶⁸: 210-213 °C)

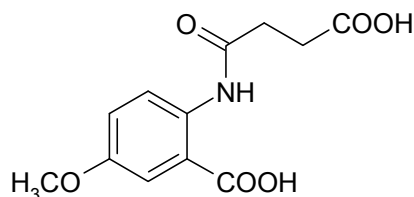
5-Hydroxy-7-methoxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (37b)



Alle Arbeitsschritte werden unter Stickstoff-Atmosphäre und unter Verwendung eines Metallkühlers durchgeführt. Eine 35%ige Suspension von Kaliumhydrid in Mineralöl (2.30 g, 0.0580 mol) (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) wird dreimal mit getrocknetem Toluol (jeweils 15 ml) gewaschen und anschließend in getrocknetem Toluol (15 ml) suspendiert. 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-methoxybenzoesäureethylester (**36b**) (3.22 g, 10.0 mmol) wird in *N,N*-Dimethylformamid (5 ml) und getrocknetem Toluol (35 ml) gelöst und sehr langsam über einen Tropftrichter in die im Silikonbad auf 0-10 °C gekühlte Kaliumhydridsuspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird der Reaktionsansatz 3 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden sehr vorsichtig Eisessig (1.5 ml) und Wasser (35 ml) zugegeben. Es bildet sich ein weißer Niederschlag, der abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält 1.75 g (63%) beige Kristalle.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

Schmp.: 187 °C (Zers.) (Lit.¹⁵⁶: 191-193 °C (Zers.))

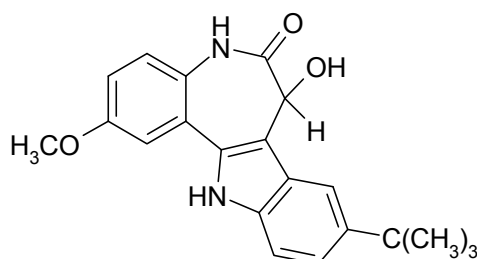
2-[(3-Carboxypropanoyl)amino]-5-methoxybenzoesäure (38)

Bei einem Versuch zur Darstellung von **37b** wurde statt des angestrebten Reaktionsproduktes die Dicarbonsäure **38** erhalten. Dieses Ergebnis wird darauf zurückgeführt, dass durch verwendete Geräte und Lösungsmittel Wasser in den Reaktionsansatz gelangte. Das aus Wasser und Kaliumhydrid entstandene Kaliumhydroxid führte dann zur Hydrolyse der Estergruppen des Eduktes, weshalb die angestrebte Dieckmann-Kondensation ausblieb.

2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-methoxybenzoesäureethylester (**36b**) (322 mg, 1.00 mmol) wird in *N,N*-Dimethylformamid (1 ml) und getrocknetem Toluol (5 ml) gelöst und sehr langsam über einen Tropftrichter in die im Siliconbad auf 0-10 °C gekühlte Kaliumhydridsuspension (0.20 g, 5.0 mmol) in getrocknetem Toluol (2 ml) getropft und analog zu der Synthese von **37b** umgesetzt. Nach Zugabe von Essigsäure (0.5 ml) und Wasser (10 ml) bildet sich ein hellgelber Niederschlag, der abgesaugt und mit Wasser und Petrolether nachgewaschen wird. Man erhält 115 mg (42%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 204-208 °C; IR (KBr): 3329 cm⁻¹ (NH), 2971 cm⁻¹ und 2917 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1693 cm⁻¹ und 1667 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.52-2.55 und 2.58-2.60 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 7.20 (dd, 1H, *J* = 9.0/3.0 Hz, ArH), 7.43 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, ArH), 8.33 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, ArH), 10.83 (s, 1H, NH), 12.31 (br s, 1H, COOH), 13.62 (br s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 28.6 (CH₂), 31.8 (CH₂); 55.3 (OCH₃); 114.5, 120.0, 121.8 (tert. C); 118.0, 134.0, 153.9, 169.0, 169.7, 173.6 (quart. C); C₁₂H₁₃NO₆ [267.24]; ber. C 53.93, H 4.90, N 5.24; gef. C 53.93, H 4.96, N 5.08.

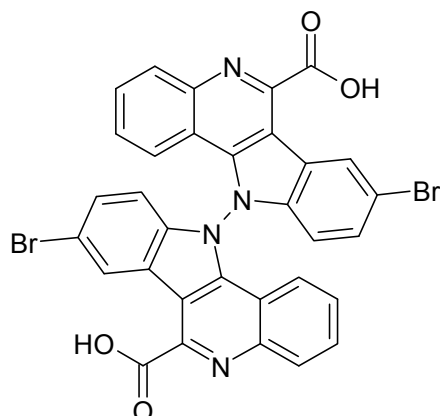
9-*tert*-Butyl-7-hydroxy-2-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on
(66I)



Weil es bei der Synthese der Verbindung **22I** zunächst Probleme mit der Isolierung des Produktes gab, wurde der gesamte Reaktionsansatz säulenchromatographisch aufgetrennt. Der Ansatz wurde mit Wasser versetzt, der so entstandene Niederschlag abgesaugt und nach Zugabe von Kieselgel (1 g) und Ethylacetat (10 ml) im Vakuum zur Trockne eingedampft. Auf dem Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsansatzes konnte im Verlauf der Reaktion eine Vielzahl von Nebenprodukten detektiert werden, die eine säulenchromatographische Auftrennung erschwerten. Unter Verwendung eines Elutionsgradienten mit einem Fließmittelgemisch aus Petrolether und Ethylacetat (1 + 2) mit langsam steigender Polarität bis hin zu einem Gemisch aus Ethanol und Ethylacetat (1 + 1) konnten diverse Fraktionen isoliert werden. Aufgrund der Vielzahl an Nebenprodukten mit ähnlichen R_f -Werten waren die meisten Fraktionen nicht rein und wurden verworfen. Die Isolierung einer nur schwach verunreinigten Fraktion ergab das in Kapitel 3.5.1 abgebildete ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **66I**. Da von diesem Nebenprodukt nur wenige Milligramm isoliert werden konnten, konnte die Substanz nicht vollständig charakterisiert werden.

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.42 (s, 9H, 3x CH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 5.31 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, CH-OH), 5.46 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, CH-OH), 7.01 (dd, 1H, $J = 8.4/2.8$ Hz, ArH), 7.23 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, ArH), 7.32-7.35 (m, 2H, ArH), 7.43 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.85 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, ArH), 10.19 (s, 1H, Lactam-NH), 11.59 (s, 1H, Indol-NH); $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ [350.41]; MS (EI): m/z (%) = 350 (16) $[\text{M}]^+$; HRMS: ber. 350.1630; gef. 350.1613.

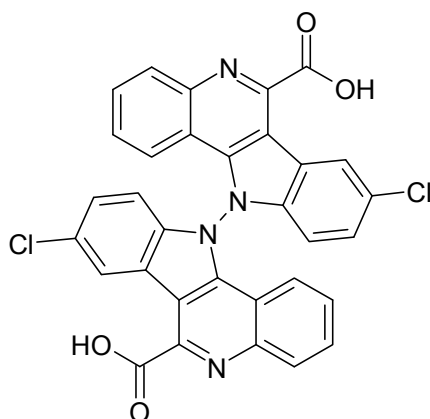
N,N'-Bis-(8-brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure) (**86a**)



Nach AAV 6 aus 9-Brom-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3a**, Ken-paullon) (65 mg, 0.20 mmol) und 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (136 mg, 0.600 mmol). Reaktionszeit: 6 Tage. Man erhält 30 mg (44%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: ab 310 °C (unter Zersetzung) (Lit.³³: ab 325 °C (unter Zersetzung)); HPLC: 95.0% bei 254 nm und 94.5% bei 280 nm, t_s = 2.03 min, t_m = 1.02 min (ACN/ H₂O + Ameisensäure; 30:70), λ_{max} : 238, 265, 282 nm.

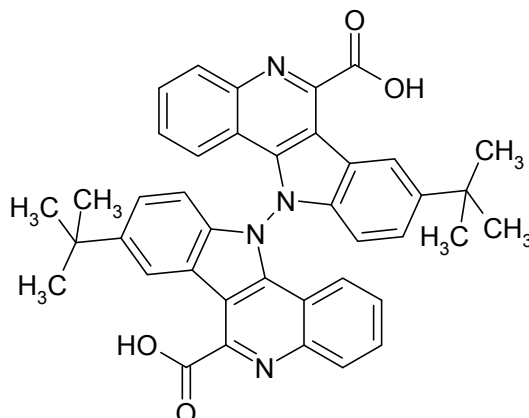
N,N'-Bis-(8-chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure) (**86b**)



Nach AAV 6 aus 9-Chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3b**) (57 mg, 0.20 mmol) und 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (136 mg, 0.600 mmol). Reaktionszeit: 6 Tage. Man erhält 49 mg (42%) eines hellgelben Pulvers.

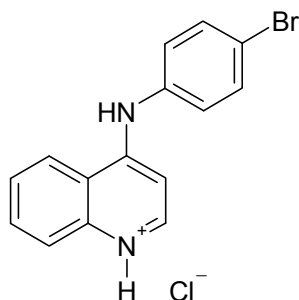
Schmp.: ab 305 °C (unter Zersetzung) (Lit.³³: ab 310 °C (unter Zersetzung)); HPLC: 100.0% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, t_s = 3.17 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 25:75), λ_{\max} : 237, 265, 280 nm.

N,N'-Bis-(8-*tert*-butyl-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure) (86c)



Nach AAV 6 aus 9-*tert*-Butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**3d**) (652 mg, 2.15 mmol) und 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (1816 mg, 6.000 mmol). Reaktionszeit: 7 Tage. Man erhält 466 mg (69%) eines hellgelben Pulvers.

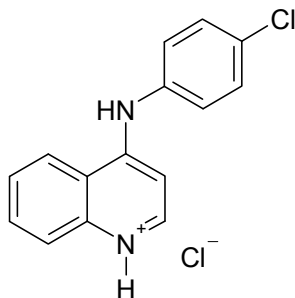
Schmp.: 250-260 °C (unter Zersetzung, Gasentwicklung); IR (KBr): 3112 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2959 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1629 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.43 (s, 18H, 2x (3x CH₃)), 7.70 (dd, 2H, J = 8.6/1.8 Hz, ArH), 7.74 (d, 2H, J = 8.6 Hz, ArH), 7.85-7.88 (m, 2H, ArH), 7.92-7.96 (m, 2H, ArH), 8.42 (d, 2H, J = 8.3 Hz, ArH), 8.68 (d, 2H, J = 8.1 Hz, ArH), 8.99 (d, 2H, J = 1.5 Hz, ArH), 13.42 (br s, 2H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (6C) (CH₃); 34.7 (2C) (C(CH₃)₃); 111.5 (2C), 120.5 (2C), 122.4 (2C), 124.8 (2C), 125.4 (2C), 127.4 (2C), 130.2 (2C) (tert. C); 111.6 (2C), 116.3 (2C), 121.2 (2C), 137.9 (2C), 138.8 (2C), 143.6 (2C), 144.1 (2C), 146.6 (2C), 164.6 (2C) (quart. C); C₄₀H₃₄N₄O₄ [634.72]; ber. C 75.69, H 5.40, N 8.83; gef. C 73.86, H 5.98, N 8.58; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, t_s = 3.91 min, t_m = 1.02 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 35:65), λ_{\max} : 235, 265, 283 nm.

4-(4-Bromanilino)chinoliniumhydrochlorid (89a)

Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Bromanilin (172 mg, 1.00 mmol). Nach Umkristallisation aus n-Hexan/Ethanol erhält man 105 mg (35%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 259 °C; IR (KBr): 2360 cm⁻¹ und 2341 cm⁻¹ (NH⁺); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 6.86 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, ArH), 7.48-7.50 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.75-7.82 (m, 3H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems und zweites Multiplett überlagert), 8.01-8.05 (m, 1H, ArH), 8.14 (dd, 1H, *J* = 8.6/1.0 Hz, ArH), 8.53 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, ArH), 8.91 (dd, 1H, *J* = 8.6/0.8 Hz, ArH), 11.16 (s, 1H, NH), 14.96 (br s, 1H, NH⁺); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 99.9, 120.2, 123.8, 126.9, 127.4 (2C), 132.7 (2C), 133.7, 142.7 (tert. C.); 117.2, 119.6, 136.7, 138.2, 154.7 (quart. C); C₁₅H₁₂ClBrN₂ [335.63]; ber. C 53.68, H 3.61, N 8.35; gef. C 53.55, H 3.43, N 8.00.

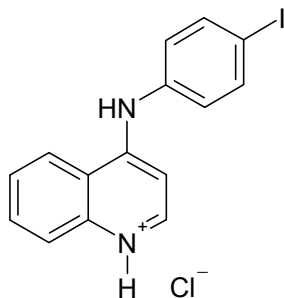
4-(4-Chloranilino)chinoliniumhydrochlorid (89b)



Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Chloranilin (128 mg, 1.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethylacetat/Ethanol erhält man 253 mg (87%) gelbgrünliche Kristalle.

Schmp.: 266-267 °C; IR (KBr): 3088 cm^{-1} und 3024 cm^{-1} (CH aromatisch), 2678 cm^{-1} (NH^+); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = 6.84 (d, 1H, J = 7.1 Hz, ArH), 7.54-7.57 (m, 2H, ArH, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 7.61-7.65 (m, 2H, ArH, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 7.78-7.82 (m, 1H, ArH), 8.01-8.05 (m, 1H, ArH), 8.15 (dd, 1H, J = 8.6/1.0 Hz, ArH), 8.53 (d, 1H, J = 6.8 Hz, ArH), 8.92 (dd, 1H, J = 8.6/0.8 Hz, ArH), 11.21 (s, 1H, NH), 14.99 (br s, 1H, NH^+); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 99.9, 120.1, 123.9, 126.9, 127.2 (2C), 129.7 (2C), 133.7, 142.6 (tert C.); 117.2, 131.3, 136.2, 138.2, 154.8 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2$ [291.18]; ber. C 61.87, H 4.12, N 9.62; gef. C 61.80, H 4.18, N 9.24.

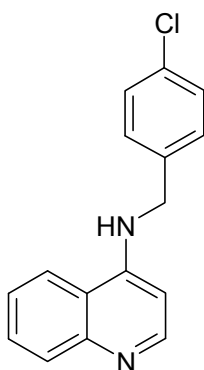
4-(4-Iodanilino)chinoliniumhydrochlorid (89c)



Nach AAV 4 aus 4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Iodanilin (219 mg, 1.00 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethylacetat/Ethanol erhält man 308 mg (81%) gelbgrünliche Kristalle.

Schmp.: 256 °C; IR (KBr): 3094 cm^{-1} (CH aromatisch), 2597 cm^{-1} (NH^+); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ (ppm) = 6.86 (d, 1H, J = 6.8 Hz, ArH), 7.33-7.36 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.77-7.81 (m, 1H, ArH), 7.89-7.92 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.00-8.05 (m, 1H, ArH), 8.15 (dd, 1H, J = 8.5/0.8 Hz, ArH), 8.52 (d, 1H, J = 7.1 Hz, ArH), 8.94 (d, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 11.20 (s, 1H, NH), 15.03 (br s, 1H, NH^+); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 99.9, 120.1, 123.9, 126.9, 127.4 (2C), 133.7, 138.5 (2C), 142.5 (tert C.); 92.3, 117.2, 137.1, 138.2, 154.6 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClIN}_2$ [380.63]; ber. C 47.33, H 3.16, N 7.36; gef. C 47.19, H 3.16, N 6.99.

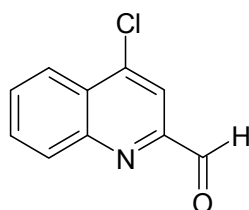
N-(4-Chlorbenzyl)chinolin-4-amin (92)



4-Chlorchinolin (164 mg, 1.00 mmol) und 4-Chlorbenzylamin (122 μl , 1.00 mmol) werden unter Erwärmen in Phenol (750 mg, 8.00 mmol) gelöst. Die Lösung wird unter Rühren 3 h auf 150 °C erwärmt. Nach Abkühlen wird Dichlormethan (20 ml) zugesetzt und dreimal mit Natronlauge (insgesamt 80 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisation aus n-Hexan/Ethylacetat erhält man 59 mg (22%) farblose Kristalle.

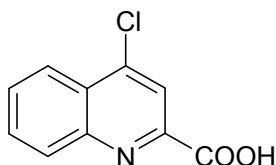
Schmp.: 186-188 °C; IR (KBr): 3246 cm^{-1} (NH), 3011 cm^{-1} (CH aromatisch), 2972 cm^{-1} (CH aliphatisch); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 4.55 (d, 2H, J = 6.1 Hz, Benzyl- CH_2), 6.30 (d, 1H, J = 5.6 Hz, ArH), 7.37-7.42 (m, 4H, ArH, AA'XX'-System), 7.44-7.48 (m, 1H, ArH), 7.60-7.64 (m, 1H, ArH), 7.79 (dd, 1H, J = 8.5/1.1 Hz, ArH), 7.90 (t, 1H, J = 6.1 Hz, NH), 8.28 (dd, 1H, J = 8.5/1.1 Hz, ArH), 8.30 (d, 1H, J = 5.3 Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 44.8 (Benzyl- CH_2); 98.9, 121.5, 123.9, 128.3 (2C), 128.7 (3C), 129.0, 150.4 (tert. C); 118.8, 131.3, 137.9, 148.2, 149.5 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2$ [268.74]; ber. C 71.51, H 4.88, N 10.42; gef. C 70.71, H 4.88, N 10.20.

4-Chlorchinolin-2-carbaldehyd (93)



4-Chlorchinaldin (1130 μl , 5.600 mmol) wird in Dioxan (60 ml) gelöst (vorher auf Peroxide testen!). Selendioxid (766 mg, 6.90 mmol) wird zugegeben. Der Ansatz wird unter Stickstoff-Atmosphäre 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz filtriert und anschließend zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird aus Cyclohexan umkristallisiert. Man erhält 590 mg (55%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 133 °C (Lit.¹²⁸: 136-139 °C)

4-Chlorchinolin-2-carbonsäure (**94**)

4-Chlorchinolin-2-carbaldehyd (**93**) (191 mg, 1.00 mmol) wird unter Erwärmen in Aceton (5 ml) gelöst und anschließend zum Rückfluss erhitzt. In Anteilen wird nach und nach Kaliumpermanganat (269 mg, 1.70 mmol) zugegeben, wenn jeweils die violette Permanganatfarbe verschwunden ist. Sobald das Edukt dünnschichtchromatographisch nicht mehr zu detektieren ist, wird heiß filtriert. Das entstandene Produkt ist in Aceton schwer löslich. Große Anteile an Produkt werden mit dem Braunstein zusammen abfiltriert, deshalb wird der Braunstein in Acetonitril aufgekocht, erneut heiß filtriert und das Acetonitril unter Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand (92 mg, 44%) wird direkt weiter zur Synthese von **29a** und **b** eingesetzt.

HPLC: 100.0% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, t_s = 2.65 min, t_m = 1.03 min (ACN/H₂O + Ameisensäure; 35:65), λ_{max} : 238, 303 nm.

Anhang zu Abschnitt 7.2: Chemikalien mit besonderem Gefährdungspotential

Beim Umgang mit den im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten. Auch alle anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe müssen unter Beachtung der einschlägigen Gefahrenhinweise und Sicherheitsregeln (R- und S-Sätze) gehandhabt werden.

Anilin und seine Derivate

T(+) (Sehr) giftig, N Umweltgefährdend

R 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-68-50:

Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut - Verdacht auf krebserzeugende Wirkung - Gefahr ernster Augenschäden - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich - Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken - Irreversibler Schaden möglich - Sehr giftig für Wasserorganismen

S 26-27-36/37/39-45-46-61-63:

Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen) - Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen - Freisetzung in die Umwelt vermeiden - Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen - Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen

2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon

T Giftig

R 25-29:

Giftig beim Verschlucken - Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase

S 22-24/25-37-45:

Staub nicht einatmen - Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden - Geeignete Schutzhandschuhe tragen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen)

Dichlormethan

Xn Gesundheitsschädlich

R 40:

Verdacht auf krebserzeugende Wirkung

S 23.2-24/25-36/37:

Dampf nicht einatmen - Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden - Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen

N,N-Dimethylformamid

T Giftig

R 61-E20/21-36:

Kann das Kind im Mutterleib schädigen - Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut - Reizt die Augen

S 53-45:

Exposition vermeiden - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen)

1,4-Dioxan

F Leichtentzündlich, Xn Gesundheitsschädlich

R 11-19-36/37-40-66:

Leichtentzündlich - Kann explosionsfähige Peroxide bilden - Reizt die Augen und die Atmungsorgane - Verdacht auf krebserzeugende Wirkung - Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen

S 9-16-36/37-46:

Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren - Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen - Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen - Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder das Etikett vorzeigen

Kaliumhydrid, 35%ige Suspension in Paraffinöl

F Leichtentzündlich, C Ätzend

R 14/15-34:

Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase - Verursacht Verätzungen

S 7/8-26-36/37/39-43.6-45:

Behälter trocken und dicht geschlossen halten - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen - Zum Löschen Sand verwenden, kein Wasser verwenden - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen)

Natriumhydrid, 60%ige Suspension in Mineralöl

F Leichtentzündlich, C Ätzend

R 15-34:

Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase - Verursacht Verätzungen

S 7/8-26-36/37/39-43.6-45:

Behälter trocken und dicht geschlossen halten - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen - Zum Löschen Sand verwenden, kein Wasser verwenden - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen)

Phenol

T Giftig, C Ätzend

R 23/24/25-34-48/20/21/22-68:

Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut - Verursacht Verätzungen - Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken - Irreversibler Schaden möglich

S 24/25-26-28.6-36/37/39-45:

Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen)

Phenylhydrazin und seine Derivate

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-E23/24/25-36/38-43-E48/23/24/25-50-68:

Kann Krebs erzeugen - Auch giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut - Reizt die Augen und die Haut - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich - Auch giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken - Sehr giftig für Wasserorganismen - Irreversibler Schaden möglich

S 53-45-61:

Exposition vermeiden - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen) – Freisetzung in die Umwelt vermeiden - Besondere Anweisungen einholen bzw. Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Selendioxid

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 23/25-33-50/53:

Giftig beim Einatmen und Verschlucken - Gefahr kumulativer Wirkungen - Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

S 20/21-28.1-45-60-61:

Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen - Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich das Etikett vorzeigen) - Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen - Freisetzung in die Umwelt vermeiden - Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Tetrahydrofuran

F Leichtentzündlich, Xi Reizend

R 11-19-36/37:

Leichtentzündlich - Kann explosionsfähige Peroxide bilden - Reizt die Augen und die Atmungsorgane

S 16-29-33:

Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen - Nicht in die Kanalisation gelangen lassen - Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen

7.3 Biologische Daten

7.3.1 Malatdehydrogenase-Testung

Herstellung von Lösungen und Reagentien

Trizma-Puffer 100 mM:

TRIZMA[®]-Base (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol) von Sigma (T-1503) (12.11 g, 100.0 mmol) wird in einem 1000 ml Messkolben in ca. 850 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wird mit 10%iger HCl auf pH 8,5 eingestellt. Anschließend wird mit Aqua bidest. auf 1000 ml (ca. ± 1 ml) aufgefüllt.

Die Lösung muss vor und während der Messung auf 25 °C temperiert werden.

L-Malat-Lösung 0.5 M:

L-Malat (Dinatriumsalz) von Sigma (M-9138) (1.78 g, 10.0 mmol) wird zu 20.0 g in Trizma Puffer gelöst.

Die Lösung muss vor und während der Messung auf 25 °C temperiert werden.

NAD⁺-Lösung 16 mM:

NAD⁺ von Fluka (43410) (10.614 mg, 16.000 μ mol) wird in 1000 μ l Trizma Puffer gelöst.

Die Lösung sollte vor und während der Messung auf 25 °C temperiert werden.

NAD⁺-Lösung 0.2 mM:

Für die Kinetikuntersuchung wird zusätzlich noch eine **0.2 mM** NAD⁺-Lösung hergestellt. Dafür wird NAD⁺ (3.317 mg, 5.000 μ mol) in einem 25 ml Messkolben in Trizma-Puffer zu 25 ml (± 0.04 ml) gelöst.

MDH-Lösung 0,5%:

5 μ l mitochondriale Malatdehydrogenase vom Schweineherz (50%ige Lösung in Glycerol, mit Kaliumphosphat-Puffer auf pH = 7.5 eingestellt) von Sigma (M-2634) werden mit Trizma Puffer zu 1000 μ l verdünnt. Die Enzymlösung wird je nach Aktivität des Enzyms mit Trizma-Puffer weiter verdünnt.

Die Lösung ist vor jeder Messung frisch anzusetzen und eiszukühlen!

Lösungen mit Inhibitor

Übersichtsmessung bei 10 μM

Für die Übersichtsmessung bei einer Finalkonzentration von 10 μM Inhibitor in der Küvette wird eine **Stammlösung (a) mit 10 mM** Inhibitor in DMSO hergestellt. Diese wird in einem Verdünnungsschritt 1:10 mit DMSO verdünnt; **(b)** ist dann **1 mM**. 10 μl dieser Lösung **(b)** werden zur Messung direkt in die Küvette (Flüssigkeitsvolumen 1000 μl) pipettiert. Diese 1:100-Verdünnung bewirkt bei einem Endvolumen von 1000 μl eine **finale Konzentration (c)** des Inhibitors von 0.01 mM = **10 μM** .

IC₅₀-Bestimmung

Aus der **Stammlösung (a) (c = 10 mM)** werden verschiedene Verdünnungen mit DMSO hergestellt (5 mM, 2.5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.1 mM, 0.05 mM).

Messprinzip

Alle Messungen zur Bestimmung der mMDH-inhibitorischen Aktivität der Verbindungen wurden an dem Zweistrahlphotometer Specord® 200 (Analytik Jena AG) bei 25 °C durchgeführt. Die von der mMDH katalysierte Umwandlung von L-Malat in Oxalacetat wurde durch die damit verbundene Entstehung von NADH/H⁺ spektralphotometrisch verfolgt. Die kontinuierliche Zunahme von NADH/H⁺ wurde über einen Zeitraum von 2.5 Minuten bei dem Absorptionsmaximum von NADH/H⁺ ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) detektiert. Die Konzentration der mMDH wurde so gewählt, dass für diesen Zeitraum ein linearer Zusammenhang zwischen der Zunahme der Absorption und der Zeit besteht (55-70 mAU/min).³³ Innerhalb der 2.5 Minuten Messzeit wurden 50 Datenpunkte aufgenommen, aus denen die Steigung $\Delta A/\Delta t$ der resultierenden Gerade direkt von dem Programm Win ASPECT® berechnet wurde. Die Umsetzungsgeschwindigkeit, die bei Messungen ohne Inhibitor detektiert wird, entspricht der Aktivität des ungehemmten Enzyms und wird mit 100% gleichgesetzt. Bei Anwesenheit eines Inhibitors wird die Enzymaktivität gehemmt, und die Umsetzungsgeschwindigkeit und damit die Zunahme von NADH/H⁺ über den gemessenen Zeitraum sinken ab. Wird die resultierende erniedrigte Steigung mit der Steigung, die bei der ungehemmten Enzymaktivität erhalten wurde, ins Verhältnis gesetzt, wird die Restaktivität des Enzyms bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration erhalten:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\Delta A / \Delta t \text{ Probe [mAU/min]}}{\Delta A / \Delta t \text{ ungehemmte Enzymaktivität [mAU/min]}} \cdot 100\%$$

Gleichung 7-1: Formel zur Berechnung der Restaktivität bei einer bestimmten Konzentration an potentielltem Inhibitor

Jede Messung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

	Blindprobe	Messlösung
Trizma-Puffer [µl]	790	790
Enzymlösung [µl]	0	3-10
DMSO/Probelösung [µl]	10	10
Mischen und 3 Minuten inkubieren (Stoppuhr!)		
NAD ⁺ -Lösung [µl]	50	50
Malat-Lösung [µl]	150	150

Schema 7-1: Pipettierschema für die Bestimmung der Restaktivitäten der mMDH nach Inkubation mit potentiellen Inhibitoren

In einer Halbmikroküvette (1.5 ml, Schichtdicke 1 cm, Firma Sarstedt) werden 790 µl Trizma-Puffer (pH = 8.5) vorgelegt. 3-10 µl einer 0.5 bzw. 0.25 %igen MDH-Lösung werden hinzupipettiert. Die Menge an Enzymlösung und deren Verdünnung wird jeder individuellen Enzymcharge angepasst, so dass die Umsetzungsgeschwindigkeit des reinen Enzyms zu einer Zunahme der Absorption von NADH/H⁺ von 55-70 mAU/min führt. Diese Werte wurden bereits von Kohfeld³³ experimentell ermittelt. Direkt anschließend werden 10 µl reines DMSO (bei der Bestimmung der reinen Enzymaktivität) bzw. 10 µl der jeweiligen Probelösung (bei der Bestimmung der Restaktivität) zugegeben. Die Küvette wird mit Parafilm und einem Finger verschlossen und dreimal um 180 ° umgeschwenkt, um die einzelnen Komponenten zu durchmischen. Die Mischung wird genau drei Minuten inkubiert (Stoppuhr!). Zur Initiation der Enzymreaktion werden danach 50 µl NAD⁺-Lösung und 150 µl L-Malat-Lösung

zupipettiert, und die Lösung wird wie oben beschrieben erneut durchmischt und schnell in den Küvettenhalter des Spektrometers gestellt. Die Absorptionszunahme wird ab dann sofort gemessen. Jede Messung erfolgt gegen eine Blindlösung, die alle Komponenten bis auf die mMDH-Lösung enthält (Schema 7-1).

Übersichtstestungen bei 10 μM

Es wurde zunächst die Restaktivität der mMDH nach Inkubation mit dem potentiellen Inhibitor bei einer Finalkonzentration (**c**) in der Küvette von 10 μM bestimmt. Dafür wurden nach dem Schema 7-1 10 μl einer **1 mM** Stammlösung der jeweiligen Verbindung in die Küvette pipettiert. Von jeder Verbindung wurden zwei individuelle Stammlösungen hergestellt. Pro Stammlösung wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. In den Tabellen in Kapitel 4 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen dieser Mittelwerte (s_M) der beiden Restaktivitäten angegeben.

Bestimmung der IC_{50} -Werte

Für eine IC_{50} -Bestimmung wurden fünf bis sieben verschiedene Verdünnungen eines potentiellen Inhibitors hergestellt, die zu folgenden Finalkonzentrationen (**c**) in der Küvette führten: 0.5 μM , 1 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM . Die Restaktivitäten der mMDH wurden bei jeder Inhibitorkonzentration ermittelt. Für jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte wurden graphisch gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Der jeweilige IC_{50} -Wert wurde rechnerisch mit dem Programm Graph Pad Prism[®] Version 4.00 berechnet. Für jeden Inhibitor wurden zwei unabhängige IC_{50} -Kurven ermittelt. In den Tabellen in Kapitel 4 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen dieser Mittelwerte (s_M) der beiden IC_{50} -Werte angegeben.

Berechnung der Standardabweichung des Mittelwertes (s_M)

Die in den Tabellen angegebene Standardabweichung des Mittelwertes s_M (SEM = *standard error of the mean*) wurde nach folgender Formel berechnet:¹⁵⁹

$$s_M = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

mit s = Standardabweichung; N = Anzahl der Messungen

Gleichung 7-2: Formel zur Berechnung der Standardabweichung des Mittelwertes s_M (SEM)¹⁵⁹

Die Standardabweichung s wurde nach folgender Formel berechnet:¹⁵⁹

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

mit x_i = Einzelwert, \bar{x} = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen

Gleichung 7-3: Formel zur Berechnung der Standardabweichung s ¹⁵⁹

Enzymkinetische Messungen

Für Verbindung **5n** wurde die Reaktionskinetik näher untersucht.

Dafür wurde die Enzymaktivität der mMDH bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (0 μM , 1 μM , 2.5 μM , 5 μM und 10 μM) und verschiedenen Konzentrationen des Cosubstrates NAD^+ bestimmt. Verschiedene Volumina (Schema 7-2) der 0.2 mM NAD^+ -Stammlösung wurden in die Küvette pipettiert, um folgende Finalkonzentrationen zu erreichen: 5 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM und 150 μM .

Finalkonzentration NAD^+ [μM]	5	25	50	75	100	150
Trizma-Puffer [μl]	815	715	590	465	340	90
Probe in gleichbleibender Konzentration [μl] bzw. DMSO	10	10	10	10	10	10
MDH 0.25 % [μl] ^a	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10
Mischen und 3 Minuten inkubieren (Stoppuhr!)						
NAD^+ -Lösung 0.2 mM [μl]	25	125	250	375	500	750
L-Malat [μl]	150	150	150	150	150	150

^a Je nach Enzymaktivität der verwendeten Enzymlösung wurde ein Volumen von 3-10 μl zupipettiert. Das zugesetzte Volumen wurde so gewählt, dass eine Umsetzungsgeschwindigkeit von 55-70 mAU/min daraus resultierte.

Schema 7-2: Pipettierschema für die enzymkinetischen Messungen

Die gemessenen Umsetzungsgeschwindigkeiten $\Delta A/\Delta t$ bei den verschiedenen Konzentrationen von **5n** wurden gegen die Konzentration von NAD^+ aufgetragen. Das so erhaltene Michaelis-Menten-Diagramm ist in Kapitel 4.1.6 abgebildet. Auch die reziproken Umsetzungsgeschwindigkeiten wurden gegen die reziproken Konzentrationen von NAD^+ aufgetragen, um ein Lineweaver-Burk-Diagramm zu erhalten (Kapitel 4.1.6). In Tabelle 7-1 sind die gemessenen Steigungen (Umsetzungsgeschwindigkeiten) bei verschiedenen NAD^+ - und Inhibitorkonzentrationen dargestellt.

Tabelle 7-1: Umsetzungsgeschwindigkeiten der mMDH [mAU/min] bei verschiedenen Konzentrationen von **5n** und NAD^+

Inhibitor 5n [μM]	NAD^+ [μM]					
	5	25	50	75	100	150
0	0.61	2.77	4.39	5.77	6.78	7.66
1	0.71	2.75	4.44	5.63	6.42	7.54
2.5	0.45	1.49	3.04	4.5	5.05	5.13
5	0.08	0.42	1.03	2.20	3.12	3.09
10	-	-	0.13	0.29	0.48	1.03

- zu geringe Absorptionszunahme, Detektion nicht möglich

Bei jeder NAD^+ -Konzentration erfolgte für jede Inhibitorkonzentration eine Dreifachbestimmung.

7.3.2 Testung auf Inhibition humaner Sirtuine

Alle Vertreter der Stoffklasse der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **5** und einige 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** wurden von der Arbeitsgruppe von Manfred Jung (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber rekombinanten humanen Sirtuinen SIRT1 und SIRT2 getestet. Zunächst wurden Restaktivitäten der Sirtuine bei Anwesenheit von 100 und 50 μM des potentiellen Inhibitors bestimmt. Waren die Ergebnisse dieser Übersichtsmessungen erfolgversprechend, wurden daraufhin IC_{50} -Werte experimentell ermittelt (Tabellen 4-9 und 4-10).

Durchführung:^{35, 53, 151}

Zunächst wurden Stammlösungen des jeweiligen Inhibitors in DMSO hergestellt. Der Assay wurde auf 96-well Mikrotiterplatten (BMG Labtechnologies, Deutschland) durchgeführt. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden nacheinander folgende Lösungen zusammen pipettiert:

- Sirtuin-Puffer (pH = 8; 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl_2)
- Enzymlösung (mit Puffer so verdünnt, dass sich ein Enzymumsatz von 10-30 % ergibt); SIRT1 (Biomol) und SIRT2 (rekombinant als *N*-terminales His-Tag-Fusionsprotein hergestellt)³⁵
- Inhibitor (in DMSO gelöst)
- Substratlösung (ZMAL)
- NAD^+ -Lösung (6 mM in Sirtuin-Puffer)

Diese Mischung wurde 240 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der erste Reaktionsschritt (Desacetylierung von ZMAL zu ZML durch Sirtuine) durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet. Diese Stopp-Lösung bestand aus Trypsin, NAD^+ und Trypsin-Puffer.

- Trypsin-Puffer (pH = 8; 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl)

Nach Zugabe der Stopp-Lösung wurde die Platte weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz des entstandenen Aminocumarinderivates (AMC) wurde anschließend direkt mit einem Plattenreader (BMG Polarstar) mit einem Cumarinfilter (Extinktionswellenlänge $\lambda = 390$ nm; Emissionswellenlänge $\lambda = 460$ nm) gemessen. Die Hemmung der Enzymaktivität der Sirtuine durch einen potentiellen Inhibitor wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{RFU (Umsatz Inhibitor)}}{\text{RFU (100\% Umsatz)}} \cdot 100\% \quad \text{RFU = relative Fluoreszenzeinheit}$$

Gleichung 7-4: Formel zur Berechnung der Hemmung [%] der Sirtuine nach Inkubation mit einem potentiellen Inhibitor

Tabelle 7-2: Inhibitorische Aktivität einiger 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** an humanem Sirtuin SIRT1

22	R¹	R²	R³	Hemmung [%] bei 100 µM Inhibitor	Hemmung [%] bei 50 µM Inhibitor	IC₅₀-Wert ± SE
c	H	H	H	22.7	24.1	-
d	H	C(CH ₃) ₃	H	k.H.	k.H.	-
e	H	CF ₃	H	k.H.	k.H.	-
f	H	CH ₃	H	21.8	19.5	-
h	H	NO ₂	H	97.8	39.7	42.0 ± 2.5
i	H	COOH	H	k.H.	k.H.	-
j	H	H	Br	k.H.	k.H.	-
k	H	H	Cl	k.H.	k.H.	-
p	I	Cl	H	11.6	k.H.	-

7.3.3 Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität

Die Untersuchungen der kinaseinhibitorischen Aktivität einiger Verbindungen der Stoffklassen der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **5** und der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** wurden in den Laboratorien von Laurent Meijer (Station Biologique, Roscoff, Frankreich) nach publizierten Methoden durchgeführt. Kurz dargestellt wurden dazu die Kinaseaktivitäten in verschiedenen Puffern bei 30 °C und einer finalen Konzentration von ATP von 15 µM ermittelt. Die bei Blindproben gemessenen Werte wurden subtrahiert. Die Berechnung der Aktivitäten erfolgte über aufgenommenes Phosphat (als pMol während 30-minütiger Inkubationszeit). Die Aktivitäten werden in % der maximalen Aktivität (ohne Anwesenheit des Inhibitors) angegeben. Die Kontrollproben erfolgten mit entsprechenden DMSO-Verdünnungen. Von allen Messungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Standardfehler bei den IC₅₀-Werten der Aktivitätsmessungen lag unter 5%.¹⁶⁰

CDK1/Cyclin B wurde aus in der M-Phase befindlichen Seesternoozyten (*Marthasterias glacialis*) in einem Homogenisationspuffer extrahiert und mittels Affinitätschromatographie an p9^{CKShs1}-Sephrose-Kügelchen aufgereinigt. Anschließend wurde es mit freiem p9^{CKShs1} von den Sepharose-Kügelchen eluiert. Die Aktivität der Kinase wurde mit 1 mg Histon H1/ml in Anwesenheit von 15 µM [γ -³³P] ATP (3000 Ci/mmol; 1mCi/ml) in einem finalen Volumen von 30 µl bestimmt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 30 °C wurden 25 µl Anteile des Zentrifugats auf Whatman p81 Phosphorcellulose-Papierfilter aufgetragen. 20 Sekunden später wurden diese Filter fünfmal (jeweils mindestens 5 Minuten) mit einer Lösung aus 1%-iger Phosphorsäure (v/v) gewaschen. Die nassen Filter wurden in einer ACS (Amersham) Szintillationsflüssigkeit einer Szintillationsmessung unterzogen.

CDK5/p25 wurde hergestellt, indem gleiche Mengen von rekombinanter Säuger-CDK5 und p25 gemischt wurden. Die Proteine wurden in *E. coli* als GST (Glutathion-S-Transferase) Fusionsproteine exprimiert. Sie wurden an Glutathion-Agarose mittels

Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Kinaseaktivität wurde mit der für CDK1/Cyclin B beschriebenen Methode bestimmt.

GSK-3 α/β wurde durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Axin aus Schweinehirn aufgereinigt.¹⁶¹ Die Aktivitätsbestimmung wurde mit einer 1/100-Verdünnung in 1 mg BSA/ml 10 mM DTT mit 5 μ l 4 μ M GS-1 Peptidsubstrat in Puffer A in der Anwesenheit von 15 μ M [γ -³³P] ATP (3000 Ci/mmol; 1mCi/ml) in einem finalen Volumen von 30 μ l durchgeführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 30 °C wurden 25 μ l wie oben beschrieben weiter bearbeitet.

CK1 δ/ϵ wurde durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Axin aus Schweinehirn aufgereinigt.¹⁶² Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie beschrieben, allerdings wurde ein CK1-spezifisches Peptidsubstrat verwendet.

Tabelle 7-3: IC₅₀-Werte [μM] der 5-Benzyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **5** und der 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren **22** an sechs verschiedenen Kinasen

	CDK1/ Cyclin B	CDK5/ p25	GSK3	CK1	CDK2/ Cyclin A	Erk2
5a	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5b	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5c	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5d	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5e	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5f	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5g	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5h	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5i	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5j	>=10	>10	1.1	>10	>10	>10
5k	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5l	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5m	>10	>10	>10	>10	>10	>10
5n	>10	>10	>10	>10	>10	>10
22c	>10	>10	>10	>10	>10	>10
22d	>10	>10	>10	>10	>10	>10
22e	>10	>10	>10	>10	>10	>10
22f	>10	>10	>10	>10	>10	>10
22h	>10	>10	0.82	>10	>10	>10
22i	>10	>10	0.35	>10	>10	>10
22j	>10	>10	0.28	>10	>10	>10
22k	>10	>10	0.42	>10	>=10	>10
22p	>10	>10	>10	>10	>10	>10

7.3.4 In Vitro Tumorzelllinien-Screening des National Cancer Institutes

Einige der im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, USA) auf ihre wachstumshemmende Wirkung gegenüber 60 humanen Tumorzelllinien getestet. Dabei wird jede Zelllinie mit der zu testenden Substanz in einer Konzentration von 10^{-5} M 48 Stunden inkubiert. Anschließend wird das Medium entfernt, und die Zellen werden gewaschen und fixiert. Danach wird der Farbstoff Sulforhodamin B (SRB) zugegeben. Dieser Farbstoff bindet an basische Aminosäuren. Je mehr Zellmasse sich gebildet hat, desto stärker gefärbt ist der solubilierte Rückstand in den Kavitäten der Mikrotiterplatte. Diese Färbung wird spektralphotometrisch bestimmt und daraus das prozentuale Zellwachstum berechnet. Als Referenz wird die ohne potentiellen Inhibitor inkubierte Zelllinie untersucht. Aus den Ergebnissen des prozentualen Wachstums der 60 Zelllinien wird ein Mittelwert gebildet und als Bezugssenkrechte in einem Balkendiagramm (*meangraph*) abgebildet. Die Empfindlichkeiten der einzelnen Tumorzelllinien werden als waagerechte Balken dargestellt. Reagiert eine spezielle Zelllinie auf die Inkubation mit einem Inhibitor empfindlicher als die mittlere Wachstumsinhibition, so zeigt der waagerechte Balken für diese Zelllinie nach rechts. Die Balken der Zelllinien, die weniger empfindlich reagiert haben, also weniger stark in ihrem Wachstum inhibiert wurden, weisen nach links.

Zeigt eine Substanz an den 60 verschiedenen Tumorzelllinien eine vielversprechende wachstumshemmende Wirkung, werden von der Substanz GI_{50} -Werte (*growth inhibition 50%*) bestimmt. Diese GI_{50} -Werte geben die Konzentration eines Inhibitors an, bei der das Wachstum der Zellen zu 50% inhibiert wird. Zur Bestimmung eines GI_{50} -Wertes werden fünf verschiedene Verdünnungen der Substanz (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) hergestellt und deren wachstumsinhibierende Wirkungen ermittelt. Da die Substanzen dieser Arbeit keine starken wachstumsinhibierenden Wirkungen zeigten, wurden keine GI_{50} -Werte experimentell ermittelt.

Tabelle 7-4: Wachstum [%] von 60 humanen Krebszelllinien nach Inkubation mit den Verbindungen **5d**, **5j**, **5n** und **22d**, **22e** und **22j** im *in vitro* Tumorzelllinien-Screening des NCI

Zelllinie	5d	5j	5n	22d	22e	22j
Wachstum [%]						
Non-Small Cell Lung Cancer						
A549/ATCC	118.75	99.39	63.44	92.18	79.70	21.62
EKVX	105.28	89.93	66.01	81.58	78.37	76.98
HOP-62	83.95	85.25	71.23	92.54	108.98	95.96
HOP-92	80.30	72.87	66.17	75.16	89.00	81.10
NCI-H226	96.24	78.87	67.30	98.98	79.55	67.35
NCI-H23	112.67	92.88	99.08	95.17	77.72	75.22
NCI-H322M	113.60	85.75	92.31	91.07	85.79	67.99
NCI-H460	92.79	52.97	25.89	91.45	89.53	82.75
NCI-H522	94.29	88.21	69.14	91.00	35.57	66.64
Colon Cancer						
COLO 205	139.89	102.29	97.61	109.77	79.18	81.90
HCC-2998	111.22	112.61	84.58	115.10	111.32	88.30
HCT-116	91.32	43.68	45.85	96.49	68.42	66.40
HCT-15	73.77	43.38	40.29	93.05	90.21	81.63
HT29	103.87	85.25	51.35	85.11	92.53	90.63
KM12	109.39	65.63	61.41	95.76	77.06	89.19
SW-620	95.28	93.80	67.73	87.03	100.04	93.10
Breast Cancer						
BT-549	107.89	103.01	93.52	83.88	78.52	42.95
HS 578T	89.01	83.80	95.88	92.84	87.20	98.11
MCF7	92.69	43.39	42.51	85.95	70.19	85.57
MDA-MB-231/ATCC	103.65	95.88	68.11	92.90	68.26	67.15
MDA-MB-435*	113.98	105.49	64.11	81.53	88.95	76.39
MDA-MB-468	87.75	80.54	74.90	92.45	70.08	67.80

Tabelle 7-4: Fortsetzung

Zelllinie	5d	5j	5n	22d	22e	22j
Wachstum [%]						
Breast Cancer						
NCI/ADR-RES	105.21	90.61	69.92	99.78	91.98	88.66
T47-D	93.79	63.95	67.08	86.33	86.81	82.48
Ovarian Cancer						
IGROV1	107.36	59.40	73.60	43.22	7.72	72.83
OVCAR-3	124.84	70.35	71.24	100.73	94.39	91.08
OVCAR-4	105.43	72.98	93.32	79.64	85.39	73.63
OVCAR-5	100.71	103.12	88.69	97.59	98.26	84.74
OVCAR-8	108.51	95.89	67.97	94.41	56.58	75.80
SK-OV-3	103.33	94.30	71.00	94.59	111.85	97.25
Leukemia						
CCRF-CEM	74.73	65.10	38.70	-	87.49	-
HL-60(TB)	82.74	98.25	58.74	57.48	117.61	71.40
K-562	95.55	72.14	38.07	154.44	-	36.11
MOLT4	103.98	80.44	48.18	61.46	86.93	67.99
RPMI-8226	81.93	58.37	40.03	70.22	69.08	97.42
SR	83.40	88.38	55.37	77.11	94.95	44.03
Renal Cancer						
786-0	96.49	79.59	69.99	94.26	97.96	99.16
A498	94.45	88.36	91.13	90.25	99.77	77.22
ACHN	113.92	84.57	56.84	99.41	81.68	86.34
CAKI-1	125.19	227.65	23.92	91.28	49.38	45.53
RXF 393	106.11	51.87	79.20	112.63	75.57	61.58
SN12C	110.26	86.80	90.20	89.60	86.70	86.80
TK-10	102.48	121.31	94.02	106.56	104.59	105.61
UO-31	81.66	55.75	60.93	95.08	72.88	82.85

Tabelle 7-4: Fortsetzung

Zelllinie	5d	5j	5n	22d	22e	22j
Wachstum [%]						
Melanoma						
LOX IMVI	86.13	65.29	39.06	95.83	75.75	81.15
M14	102.55	84.73	82.94	97.99	93.22	92.30
MALME-3M	106.91	114.87	85.53	108.62	119.28	91.60
SK-MEL-2	97.53	121.03	105.13	74.54	86.53	91.26
SK-MEL-28	105.05	113.18	90.63	94.24	113.84	106.79
SK-MEL-5	79.64	47.08	45.12	98.76	95.09	82.74
UACC-257	116.22	138.36	92.86	111.38	96.35	43.92
UACC-62	82.29	73.44	55.57	83.86	75.11	75.25
Prostate Cancer						
DU-145	113.64	101.20	81.39	113.59	106.67	106.83
PC-3	86.21	71.89	56.14	81.74	85.17	90.01
CNS Cancer						
SF-268	101.45	85.66	57.12	91.86	94.84	90.72
SF-295	110.96	164.09	53.30	96.65	80.43	74.39
SF-539	96.63	76.29	51.24	96.66	92.87	65.39
SNB-19	95.43	76.66	62.12	106.29	107.70	87.39
SNB-75	84.88	83.70	62.55	69.94	58.92	47.58
U251	99.13	57.08	46.80	99.08	86.36	88.01
Mean	99.74	86.48	67.06	92.17	85.29	78.11

- Bei der jeweiligen Verbindung wurde diese Zelllinie nicht untersucht.

* Die Zelllinie MDA-MB-435, die hier als Brustkrebszelllinie charakterisiert ist, ist identisch mit der Melanomzelllinie M14. Diese Verwechslung wurde 2007 entdeckt.^{154, 163}

8 Literaturverzeichnis

- [1] Krebs, H. A., Johnson, W. A.: Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem. J.* **1937**, 31, 645-660.
- [2] Krebs, H. A.: The citric acid cycle. In: *Nobel lectures in Physiology or Medicine: 1942-1962*. **1999**, World Scientific Publishing, New Jersey, 399-410.
- [3] Krebs, H. A., Salvin, E., Johnson, W. A.: The formation of citric and α -ketoglutaric acids in the mammalian body. *Biochem. J.* **1938**, 32, 113-117.
- [4] Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C.: *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Aufl., **2007**, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 478-487 und 490-506.
- [5] Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R.: *Biochemie*. 1. Aufl., **2006**, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 110-122 und 164-180.
- [6] Musrati, R. A., Kollarova, M., Mernik, N., Mikulasova, D.: Malate dehydrogenase: Distribution, function and properties. *Gen. Physiol. Biophys.* **1998**, 17, 193-210.
- [7] Goward, C. R., Nicholls, D. J.: Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution and catalysis. *Protein Sci.* **1994**, 3, 1883-1888.
- [8] Roderick, S. L., Banaszak, L. J.: The three-dimensional structure of porcine heart mitochondrial malate dehydrogenase at 3.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 9461-9464.
- [9] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605-1612.
- [10] Kelland, L. R.: Cancer cell biology, drug action and resistance. In: *The royal marsden hospital handbook of cancer chemotherapy*. Brighton, D., Wood, M. **2005**, Elsevier, Edinburgh, 1-15.
- [11] Baker, B. R., Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 189. Inhibition of some dehydrogenases by derivatives of 4-hydroxyquinoline-2- and -3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 230-233.

- [12] Shah, K. J., Coats, E. A.: Design, synthesis, and correlation analysis of 7-substituted 4-hydroxy-3-carboxylic acids as inhibitors of cellular respiration. *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 1001-1006.
- [13] Balinsky, D., Greengard, O., Cayanis, E., Head, J. F.: Enzyme activities and isoenzyme pattern in human lung tumors. *Cancer Res.* **1984**, 44, 1058-1062.
- [14] Wasilenko, W. J., Marchok, A. C.: Malic enzyme and malate dehydrogenase activities in rat tracheal epithelial cells during the progression of neoplasia. *Cancer Lett.* **1985**, 28, 35-42.
- [15] Hershey, F. B., Johnston, G., Murphy, S. M., Schmitt, M.: Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases and isozymes of normal rat breast and growing and regressing breast cancers. *Cancer Res.* **1966**, 26, 265-268.
- [16] Washizu, T., Azakami, D., Bonkobara, M., Washizu, M., Arai, T.: Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in canine lymphoma cells. *J. Vet. Med. Sci.* **2005**, 67, 615-616.
- [17] Baker, B. R., Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 190. Inhibition of some dehydrogenases by 1-substituted-1,4-dihydro-4-quinolone-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 233-235.
- [18] Baker, B. R., Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 191. Hydrophobic bonding to some dehydrogenases by 6-, 7-, or 8-substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 235-237.
- [19] Baker, B. R., Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 192. Hydrophobic bonding to some dehydrogenases with 5-substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 237-240.
- [20] Baker, B. R., Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 194. Hydrophobic bonding to some dehydrogenases by substituted 5-phenylethyl-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 937-940.
- [21] Coats, E. A., Kishorkant, J. S., Milstein, S. R., Genther, C. S., Nene, D. M., Roesener, J., Schmidt, J., Pleiss, M., Wagner, E., Baker, J. K.: 4-Hydroxyquinoline-3-carboxylic acids as inhibitors of cell respiration. 2. Quantitative structure-activity relationship of dehydrogenase enzyme and Ehrlich ascites tumor cell inhibitions. *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 57-63.

- [22] Dove, S., Coats, E. A., Scharfenberg, P., Franke, R.: 7-substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids as inhibitors of dehydrogenase enzymes and of the respiration of Ehrlich ascites tumor cells: Multivariate analysis and quantitative structure-activity relationship for polar substituents. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 447-451.
- [23] Owa, T., Yoshino, H., Yoshimatsu, K., Nagasu, T.: Cell cycle regulation in the G1 phase: A promising target for development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1487-1503.
- [24] Ozawa, Y., Sugi, N. H., Owa, T., Watanabe, T., Koyanagi, N., Yoshino, H., Kitoh, K., Yoshimatsu, K.: E7070, a novel sulphonamide agent with potent antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Cancer* **2001**, 37, 2275-2282.
- [25] Oda, Y., Owa, T., Sato, T., Boucher, B., Daniels, S., Yamanaka, H., Shinohara, Y., Yokoi, A., Kuromitsu, J., Nagasu, T.: Quantitative chemical proteomics for identifying candidate drug targets. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2159-2165.
- [26] Talbot, D. C., v. Pawel, J., Cattell, E., Yule, S. M., Johnston, C., Zandvliet, A. S., Huitema, A. D. R., Norbury, C. J., Ellis, P., Bosquee, L., Reck, M.: A randomized phase II pharmacokinetic and pharmacodynamic study of indisulam as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 1816-1822.
- [27] Dittrich, C., Zandvliet, A. S., Gneist, M., Huitema, A. D. R., King, A. A. J., Wanders, J.: A phase I and pharmacokinetic study of indisulam in combination with carboplatin. *Brit. J. Cancer* **2007**, 96, 559-566.
- [28] Harris, D. G., Marx, D. P., Anderson, J. M., McCune, R. W., Zimmerman, S. S.: Kinetic and molecular modeling of nucleoside and nucleotide inhibition of malate dehydrogenase. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2002**, 21, 813-823.
- [29] Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A. M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L., Sausville, E. A.: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2566-2569.
- [30] Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L., Kunick, C.: Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis, evaluation of CDK1/Cyclin B inhibition, and *in vitro* antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2909-2919.

- [31] Knockaert, M., Wieking, K., Schmitt, S., Leost, M., Grant, K. M., Mottram, J. C., Kunick, C., Meijer, L.: Intracellular targets of paullones. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25493-25501.
- [32] Reichwald, C., Shimony, O., Dunkel, U., Sacerdoti-Sierra, N., Jaffe, C. L., Kunick, C.: 2-(3-Aryl-3-oxopropen-1-yl)-9-*tert*-butyl-paullones: A new antileishmanial chemotype. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 659-665.
- [33] Kohfeld, S.: Untersuchungen zur Synthese, biologischen Aktivität und Stabilität von Paullonen und verwandten *d*-anellierten [1]Benzazepinonen. *Dissertation Technische Universität Braunschweig* **2006**.
- [34] Luo, C., Wang, X., Long, J., Liu, J.: An NADH-tetrazolium-coupled sensitive assay for malate dehydrogenase in mitochondria and crude tissue homogenates. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, 68, 101-111.
- [35] Trapp, J.: Neue Testsysteme und Hemmstoffe für NAD⁺-abhängige Histondesacetylasen. *Dissertation Universität Freiburg* **2007**.
- [36] Kornberg, R. D., Lorch, Y.: Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **1999**, 98, 285-294.
- [37] Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J.: Crystal structure of the nucleosome particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **1997**, 389, 251-260.
- [38] Biel, M., Wascholowski, V., Giannis, A.: Epigenetik - ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme. *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3248-3280.
- [39] Schäfer, S., Jung, M.: Chromatin modifications as targets for new anticancer drugs. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 347-357.
- [40] Turner, B. M.: Histone acetylation and control of genes. *J. Cell Sci.* **1991**, 99, 13-20.

- [41] Zhou, N., Moradei, O., Raeppl, S., Leit, S., Frechette, S., Gaudette, F., Paquin, I., Bernstein, N., Bouchain, G., Vaisburg, A., Jin, Z., Gillespie, J., Wang, J., Fournel, M., Yan, P. T., Trachy-Bourget, M.-C., Kalita, A., Lu, A., Rahil, J., MacLeod, A. R., Li, Z., Besterman, J. M., Delorme, D.: Discovery of *N*-(2-aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103), an orally active histone deacetylase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4072-4075.

- [42] Neugebauer, R. C.: Synthese und Testung von Hemmstoffen NAD⁺-abhängiger Histondesacetylasen. *Dissertation Universität Freiburg* **2007**.

- [43] Jung, M.: Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1505-1511.

- [44] Marks, P. A., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R.: Inhibitors of histone deacetylase are potentially effective anticancer agents. *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 759-760.

- [45] Buggy, J. J., Cao, A., Bass, K. E., Verner, E., Balasubramanian, S., Liu, L., Schultz, B. E., Young, P. R., Dalrymple, S. A.: CRA-024781: A novel synthetic inhibitor of histone deacetylase with antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5, 1309-1317.

- [46] Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T.: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by Trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 17174-17179.

- [47] Miller, T. A., Witter, D. J., Belvedere, S.: Histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5097-5116.

- [48] Grant, S., Easley, C., Kirkpatrick, P.: Vorinostat. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 21-22.

- [49] Siebenand, S.: Neuer Angriffspunkt in der Krebstherapie. *Pharm. Ztg.* **2008**, 153, 1438-1439.

- [50] Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., Boeke, J. D.: The biochemistry of sirtuins. *Annu. Rev. Biochem* **2006**, 75, 435-465.

- [51] North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., Verdin, E.: The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* **2003**, 11, 437-444.
- [52] Jing, E., Gesta, S., Kahn, C. R.: SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab.* **2007**, 6, 105-114.
- [53] Trapp, J., Jochum, A., Meier, R., Saunders, L., Marshall, B., Kunick, C., Verdin, E., Goekjian, P., Sippl, W., Jung, M.: Adenosine mimetics as inhibitors of NAD⁺-dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7307-7316.
- [54] Grozinger, C. M., Chao, E. D., Blackwell, H. E., Moazed, D., Schreiber, S. L.: Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 38837-38843.
- [55] Mai, A., Massa, S., Lavu, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Ragno, R., Mariotti, F. R., Chiani, F., Camilloni, G., Sinclair, D. A.: Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (sirtuin) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 7789-7795.
- [56] Ota, H., Tokunaga, E., Chang, K., Hikasa, M., Iijima, K., Eto, M., Kozaki, K., Akishita, M., Ouchi, Y., Kaneki, M.: Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* **2006**, 25, 176-185.
- [57] Heltweg, B., Gatbonton, T., Schuler, A. D., Posakony, J., Li, H., Goehle, S., Kollipara, R., DePinho, R. A., Gu, Y., Simon, J. A., Bedalov, A.: Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res.* **2006**, 66, 4368-4377.
- [58] Posakony, J., Hirao, M., Stevens, S., Simon, J. A., Bedalov, A.: Inhibitors of Sir2: Evaluation of splitomicin analogues. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2635-2644.
- [59] Neugebauer, R. C., Uchiechowska, U., Meier, R., Hruby, H., Valkov, V., Verdin, E., Sippl, W., Jung, M.: Structure-activity studies on splitomicin derivatives as sirtuin inhibitors and computational prediction of binding mode. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1203-1213.

- [60] Napper, A. D., Hixon, J., McDonagh, T., Keavey, K., Pons, J.-F., Barker, J., Tsung Yau, W., Amouzegh, P., Flegg, A., Hamelin, E., Thomas, R. J., Kates, M., Jones, S., Navia, M. A., Saunders, J. O., DiStefano, P. S., Curtis, R.: Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 8045-8054.

- [61] Solomon, J. M., Pasupuleti, R., Xu, L., McDonagh, T., Curtis, R., DiStefano, P. S., Huber, L. J.: Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, 26, 28-38.

- [62] Tervo, A. J., Suuronen, T., Krylenko, S., Kuusisto, E., Kiviranta, P. H., Salminen, A., Leppänen, J., Poso, A.: Discovering inhibitors of human sirtuin type 2: Novel structural scaffolds. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7239-7241.

- [63] Tervo, A. J., Krylenko, S., Niskanen, P., Salminen, A., Leppänen, J., Nyrönen, T. H., Järvinen, J., Poso, A.: An in silico approach to discovering novel inhibitors of human sirtuin type 2. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 6292-6298.

- [64] Huhtiniemi, T., Suuronen, T., Rinne, V. M., Wittekindt, C., Lahtela-Kakkonen, M., Jarho, E., Wallén, E. A. A., Salminen, A., Poso, A., Leppänen, J.: Oxadiazole-carbonylaminothioureas as SIRT1 and SIRT2 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4377-4380.

- [65] Pies, T.: 9-Substituted paullones: Synthesis and structure-activity relationships. *Dissertation Universität Hamburg* **2003**.

- [66] Smith, M. E., Elisberg, E., Sherrill, M. L.: Quinazoline derivatives. II. Synthesis of 4-(4'-Diethylamino-1'-methylbutylamino)-6-methoxy-quinazoline. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68, 1301-1303.

- [67] Schultz, C.: Antitumoraktive [d]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. *Dissertation Universität Hamburg* **1999**.

- [68] Kunick, C.: Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxycarbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, 324, 579-581.

- [69] Link, A.: Antitumoraktive Pyrido[3,2-d]-1-benzazepine. *Dissertation Universität Hamburg* **1996**.

- [70] Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-(5*H*)-onen und 6,11-Dihydro-thieno-[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, 325, 297-299.
- [71] Reichwald, C.: Eine neue Variante der Heck-Reaktion zur Darstellung antileishmanieller Paullone. *Dissertation Technische Universität Braunschweig* **2008**.
- [72] Böhme, H. J., Klebe, G., Kubinyi, H.: *Wirkstoffdesign*. 1. Aufl., **1996**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 147-160.
- [73] Topliss, J. G.: Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 1006-1011.
- [74] Kunick, C.: Synthese und konformative Flexibilität von 4,9-Dihydroindolo[3,2-*d*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1]benzazepinen. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1143-1145.
- [75] Gilman, N. W., Rosen, P., Earley, J. V., Cook, C., Todaro, L. J.: Atropisomers of 1,4-benzodiazepines. Synthesis and resolution of a diazepam-related 1,4-benzodiazepine. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3969-3978.
- [76] Paizs, B., Simonyi, M.: Ring inversion barrier of diazepam and derivatives: An *ab initio* study. *Chirality* **1999**, 11, 651-658.
- [77] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Aufl., **2005**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 91-99.
- [78] Friebolin, H.: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. 3. Aufl., **1999**, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 307-308.
- [79] Moore, H. W., Shelden, H. R., Weyler Jr., W.: Rearrangement of azidoquinones IV. Ring expansion of 4-azido-1,2-naphthoquinone. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 1243-1246.
- [80] Rees, A. H., Simon, K.: Some derivatives of 1-benzazepine. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 1227-1230.

- [81] Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.-J. W., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P.: Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of *N*-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 2052-2056.
- [82] Xu, F., Deussen, H.-J. W., Lopez, B., Lam, L., Li, K.: Enzymatic and electrochemical oxidation of *N*-hydroxy compounds. Redox potential, electron-transfer kinetics, and radical stability. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 4169-4176.
- [83] Coniglio, A., Galli, C., Gentili, P., Vadalà, R.: Oxidation of amides by laccase-generated aminoxyl radicals. *J. Molec. Catal. B: Enzym.* **2008**, 50, 40-49.
- [84] Li, K., Helm, R. F., Eriksson, K.-E. L.: Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1998**, 27, 239-243.
- [85] Ishii, Y., Nakayama, K., Takeno, M., Sakaguchi, S., Iwahama, T., Nishiyama, Y.: A novel catalysis of *N*-hydroxyphthalimide in the oxidation of organic substrates by molecular oxygen. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3934-3935.
- [86] Aoki, Y., Sakaguchi, S., Ishii, Y.: Synthesis of aromatic aldehydes by aerobic oxidation of hydroaromatic compounds and diarylalkanes using *N*-hydroxyphthalimide (NHPI) as a key catalyst. *Tetrahedron* **2006**, 62, 2497-2500.
- [87] Dufour, F., Kirsch, G.: Efficient synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydro-11*H*-benzo[*a*]carbazole and its regioselective oxidation. *Synlett* **2006**, 1021-1022.
- [88] Matsunaka, K., Iwahama, T., Sakaguchi, S., Ishii, Y.: A remarkable effect of quaternary ammonium bromide for the *N*-hydroxyphthalimide-catalyzed aerobic oxidation of hydrocarbons. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2165-2168.
- [89] Cecchetto, A., Fontana, F., Minisci, F., Recupero, F.: Efficient Mn-Cu and Mn-Co-TEMPO-catalysed oxidation of alcohols into aldehydes and ketones by oxygen under mild conditions. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6651-6653.
- [90] Ishii, Y., Sakaguchi, S., Iwahama, T.: Innovation of hydrocarbon oxidation with molecular oxygen and related reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 393-427.

- [91] Recupero, F., Punta, C.: Free radical functionalization of organic compounds catalyzed by *N*-hydroxyphthalimide. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3800-3842.
- [92] Minisci, F., Punta, C., Recupero, F., Fontana, F., Pedulli, G. F.: A new, highly selective synthesis of aromatic aldehydes by aerobic free-radical oxidation of benzylic alcohols, catalysed by *N*-hydroxyphthalimide under mild conditions. Polar and enthalpic effects. *Chem. Commun.* **2002**, 688-689.
- [93] Ishii, Y., Kato, S., Iwahama, T., Sakaguchi, S.: Hydroxylation of polycyclic alkanes with molecular oxygen catalyzed by *N*-hydroxyphthalimide (NHPI) combined with transition metal salts. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 4493-4996.
- [94] Iwahama, T., Yoshino, Y., Keitoku, T., Sakaguchi, S., Ishii, Y.: Efficient oxidation of alcohols to carbonyl compounds with molecular oxygen catalyzed by *N*-hydroxyphthalimide combined with a co species. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6502-6507.
- [95] Minisci, F., Punta, C., Recupero, F., Fontana, F., Pedulli, G. F.: Aerobic oxidation of *N*-alkylamides catalyzed by *N*-hydroxyphthalimide under mild conditions. Polar and enthalpic effects. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2671-2676.
- [96] Han, B., Liu, Z., Yang, L., Liu, Z.-L., Yu, W.: An efficient aerobic oxidative aromatization of Hantzsch 1,4-dihydropyridines and 1,3,5-trisubstituted pyrazolines. *Tetrahedron* **2006**, 62, 2492-2496.
- [97] Brandi, P., Galli, C., Gentili, P.: Kinetic study of the hydrogen abstraction reaction of the benzotriazol-*N*-oxyl radical (BTNO) with H-donor substrates. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9521-9528.
- [98] Karimi, B., Rajabi, J.: Novel method for efficient aerobic oxidation of silyl ethers to carbonyl compounds catalyzed with *N*-hydroxyphthalimide (NHPI) and lipophilic Co(II) complexes. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2841-2844.
- [99] Tan, S.-F., Leung, P.-H., Sin, W.-C.: Catalytic autooxidation of *p*-anisaldehyde and styrene by a cobalt *bis*-schiff base complex. *Transition. Met. Chem.* **1991**, 16, 542-545.
- [100] Matsumoto, M., Kuroda, K.: Transition metal(II) Schiff's base complexes catalyzed oxidation of trans-2-(1-propenyl)-4,5-methylenedioxyphenol to carpanone by molecular oxygen. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 4437-4440.

- [101] Becker, A., Kohfeld, S., Pies, T., Wieking, K., Preu, L., Kunick, C.: Synthesis of 11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acids by cascade autoxidation-ring contractions. *Synthesis* **2009**, 1185-1189.
- [102] Russell, G. A.: Deuterium-isotope effects of the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3871-3877.
- [103] Wentzel, B. B., Donners, M. P. J., Alsters, P. L., Feiters, M. C., Nolte, R. J. M.: *N*-Hydroxyphthalimide/cobalt(II) catalyzed low temperature benzylic oxidation using molecular oxygen. *Tetrahedron* **2000**, 56, 7797-7803.
- [104] Dolenz, G., Kollenz, G.: Zum Ringverengungsmechanismus von 1,5-Dihydro-2*H*-1,5-benzodiazepin-2,3,4-trionen. *Chem. Ber.* **1982**, 115, 593-600.
- [105] Kaupp, G., Knichala, B.: Quantitative [1,3,2,3]-Eliminierung von Wasser aus Oxazepam. *Chem. Ber.* **1985**, 118, 462-467.
- [106] Sisenwine, S. F., Tio, C. O., Liu, A. L., Politowski, J. F.: The metabolic fate of oxazepam in mice. *Drug Metab. Dispos.* **1987**, 15, 579-580.
- [107] Haran, R., Tuchagues, J. P.: Carbon-13 and proton NMR studies of 1,4-benzodiazepines. *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, 17, 1483-1488.
- [108] Itoh, S., Kato, J., Inoue, T., Kitamura, Y., Komatsu, M., Oshiro, Y.: Synthesis of pyrroloquinoline quinone derivatives: Model compounds of a novel coenzyme PQQ (methoxatin). *Synthesis* **1987**, 1067-1071.
- [109] Itoh, S., Inoue, T., Fukui, Y., Huang, X., Komatsu, M., Oshiro, Y.: Regioselective transformation of the functional groups of coenzyme PQQ. *Chem. Lett.* **1990**, 18, 1675-1678.
- [110] Heiskanen, J. P., Omar, W. A. E., Ylikunnari, M. K., Haavisto, K. M., Juan, M. J., Hormi, O. E. O.: Synthesis of 4-alkoxy-8-hydroxyquinolines. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 920-922.
- [111] Atwell, G. J., Bos, C. D., Baguley, B. C., Denny, W. A.: Potential antitumor agents. 56. "Minimal" DNA-intercalating ligands as antitumor drugs: Phenylquinoline-8-carboxamides. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1048-1052.

- [112] Nickel, P., Fink, E.: 2-, 3- und 4-Mono-, Di- und Trimethylderivate von 6-(4-Diäthylamino-1-methylbutylamino)-5,8-dimethoxychinolin. *Liebigs Ann. Chem.* **1976**, 367-382.
- [113] Crumrine, D. S., Brodbeck, C. M., Dombrowski, P. H., Haberkamp, T. J., Kekstas, R. J., Nabor, P., Nomura, G. S., Padleckas, H. A., Suther, D. J., Yonan, J. P.: Photocleavage of diarylnitrosamines in neutral media. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4246-4249.
- [114] Balsells, R. A., Frasca, A. R.: Photochemical reaction of carbazole and some derivatives in dichloromethane. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5363-5366.
- [115] He, L., Chang, H.-X., Chou, T.-C., Savaraj, N., Cheng, C. C.: Design of antineoplastic agents based on the '2-phenylnaphthalene-type' structural pattern - Synthesis and biological activity studies of 11*H*-indolo[3.2-*c*]quinoline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 101-107.
- [116] Askam, V., Deeks, R. H. L.: Derivatives of indole in an attempted cyclisation of *o*-nitrophenylsuccinic acid. *J. Chem. Soc.* **1968**, 1243-1245.
- [117] Ponce, M. A., Erra-Balsells, R.: Synthesis and isolation of nitro- β -carbolines obtained by nitration of commercial β -carboline alkaloids. *Heterocycl. Chem.* **2001**, 38, 1071-1082.
- [118] Jones, P. G.: Crystal growing. *Chem. Brit.* **1981**, 17, 222-225.
- [119] Margolis, B. J., Long, K. A., Laird, D. L. T., Ruble, J. C., Pulley, S. R.: Assembly of 4-aminoquinolines via palladium catalysis: A mild and convenient alternative to S_NAr methodology. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2232-2235.
- [120] Dhanabal, T., Sangeetha, R., Mohan, P. S.: Heteroatom directed photoannulation: Synthesis of indoloquinoline alkaloids: Cryptolepine, cryptotackieine, cryptosanguinolentine, and their methyl derivatives. *Tetrahedron* **2006**, 62, 6258-6263.
- [121] Boschelli, D. H., Wang, Y. D., Ye, F., Wu, B., Zhang, N., Dutia, M., Powell, D. W., Wissner, A., Arndt, K., Weber, J. M., Boschelli, F.: Synthesis and Src kinase inhibitory activity of a series of 4-phenylamino-3-quinolinecarbonitriles. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 822-833.

- [122] Abeywickrama, C., Rotenberg, S. A., Baker, A. D.: Inhibition of protein kinase C by dequalinium analogues: Structure-activity studies on head group variations. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7796-7803.

- [123] Avestisyan, A. A., Aleksanyan, I. L., Ambartsumyan, L. P.: Synthesis of 6,8-substituted 4-(hydroxyphenylamino)- and 4-(aminophenylamino)-2-methylquinolines. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, 43, 1048-1051.

- [124] Avestisyan, A. A., Aleksanyan, I. L., Ambartsumyan, L. P.: Synthesis and transformations of 2- and 4-(2-methylquinolin-4-ylamino)benzoic acids and ethyl 4-(2-methylquinolin-4-ylamino)benzoates and their fluorescent properties. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, 43, 1052-1057.

- [125] Galanakis, D., Calder, J. A. D., Ganellin, C. R., Owen, C. S., Dunn, P. M.: Synthesis and quantitative structure-activity relationships of dequalinium analogues as K⁺ channel blockers: Investigation into the role of the substituent at position 4 of the quinoline ring. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3536-3546.

- [126] Meyer, T.: Synthese, Cyclisierung und biologische Wirksamkeit von 4-Amino-5-hydroxy-chinolenen. *Dissertation Universität Hamburg* **2000**.

- [127] Surrey, A. R., Cutler, R. A.: The role of phenol in the reaction of 4,7-dichloroquinoline with novel diamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2623-2626.

- [128] Varlet, D., Fourmaintraux, E., Depreux, P., Lesieur, D.: Synthesis of 4-[4-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)piperazin-1-yl]-quinolines derivatives as sorbitol dehydrogenase potential inhibitors. *Heterocycles* **2003**, 60, 385-396.

- [129] Heidempergher, F., Pevarello, P., Pillan, A., Pinciroli, V., Della Torre, A., Speciale, C., Marconi, M., Cini, M., Toma, S., Greco, F., Varasi, M.: Pyrrolo[3,2-*c*]quinoline derivatives: A new class of kynurenine-3-hydroxylase inhibitors. *Il farmaco* **1999**, 54, 152-160.

- [130] Kim, R. H., Choi, J. I., Choi, S. W., Lee, K. S., Jung, Y. S., Park, W. K., Seong, C. M., Park, N. S.: A series of quinoline-2-carboxylic acid derivatives: New potent glycine site NMDA receptor antagonists. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1997**, 18, 939-945.

- [131] Chen, Y.-L., Chung, C.-H., Chen, I.-L., Chen, P.-H., Jeng, H.-Y.: Synthesis and cytotoxic activity evaluation of indolo-, pyrrolo-, and benzofuro-quinolin-2(1*H*)-ones and 6-anilinoindoloquinoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 275-2712.
- [132] Lin, Y.-H., Yang, S.-H., Chien, C.-M., Hu, X.-W., Huang, Y.-H., Lu, C.-M., Chen, Y.-L., Lin, S.-R.: Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a novel indoloquinoline derivative, IQDMA, in K562 cells. *Drug Dev. Res.* **2006**, 67, 743-751.
- [133] Hu, X.-W., Chien, C.-M., Yang, S.-H., Lin, Y.-H., Lu, C.-M., Chen, Y.-L., Lin, S.-R.: A novel indoloquinoline derivative, IQDMA, induces S-phase arrest and apoptosis in promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, 22, 417-427.
- [134] Lamazzi, C., Léonce, S., Pfeiffer, B., Renard, P., Guillaumet, G., Rees, C. W., Besson, T.: Expeditious synthesis and cytotoxic activity of new cyanoindolo[3,2-*c*]quinolines and benzimidazo[1,2-*c*]quinazolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2183-2185.
- [135] Cacchi, S., Fabrizi, G., Pace, P., Marinelli, F.: 6-Aryl-11*H*-indolo[3,2-*c*]quinolines through the palladium-catalyzed carbonylative cyclization of *o*-(*o*-aminophenyl)trifluoroacetanilide with aryl iodides. *Synlett* **1999**, 620-622.
- [136] Helissey, P., Parrot-Lopez, H., Renault, J., Cros, S.: A convenient synthesis of 1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]quinoline-6,9-diones and 11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-1,4-diones derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 3547-3557.
- [137] Kermack, W. O., Smith, J. F.: Syntheses in the indole series. Part IV. Derivatives of 2:3 benz- χ -carboline. *J. Chem. Soc.* **1930**, 1999-2010.
- [138] Copeland, R. A.: *Enzymes - A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2. Aufl., **2000**, Wiley-VCH, Inc., New York, 188-304.
- [139] John, R. A.: Photometric assays. In: *Enzyme assays - A practical approach*. Eisenthal, R., Danson, M. J. **1992**, Oxford University Press, Oxford, 58-92.
- [140] Cheng, Y.-C., Prusoff, W. H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-3108.

- [141] Robinett, R. G., Freemerman, A. J., Skinner, M. A., Shewchuk, L., Lackey, K.: The discovery of substituted 4-(3-hydroxyanilino)-quinolines as potent RET kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5886-5893.
- [142] Mallon, R., Feldberg, L., Kim, S., Collins, K., Wojciechowicz, D., Kohler, C., Kovacs, D., Discafani, C., Zhang, N., Wu, B., Floyd, B., Powell, D., Berger, D.: Identification of 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile inhibitors of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1 kinase. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 3, 755-762.
- [143] Kunick, C., Egert-Schmidt, A.-M.: Jung, kompetitive, erfolgreich - Die kurze Geschichte der Proteinkinase-Inhibitoren. *Pharm. Unserer Zeit* **2008**, 5, 360-368.
- [144] Lin, J.-J., Somero, G. N.: Thermal adaption of cytoplasmatic malate dehydrogenase of eastern pacific barracuda (*Sphyreana* spp): The role of differential isoenzyme expression. *J. Exp. Biol.* **1995**, 198, 551-560.
- [145] Seidler, J., McGovern, S. L., Doman, T. N., Shoichet, B. K.: Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4477-4486.
- [146] McGovern, S. L., Helfand, B. T., Feng, B., Shoichet, B. K.: A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4265-4272.
- [147] Feng, B. Y., Shoichet, B. K.: Synergy and antagonism of promiscuous inhibition in multiple-compound mixtures. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2151-2154.
- [148] Shoichet, B. K.: Screening in a spirit haunted world. *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 607-615.
- [149] Ryan, A. J., Gray, N. M., Lowe, P. N., Chung, C.-w.: Effect of detergent on "promiscuous" inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3448-3451.
- [150] Shoichet, B. K.: Interpreting steep dose-response curves in early inhibitor discovery. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7274-7277.
- [151] Heltweg, B., Trapp, J., Jung, M.: In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity. *Methods* **2005**, 36, 332-337.

- [152] Heltweg, B., Dequiedt, F., Verdin, E., Jung, M.: Nonisotopic substrate for assaying both human zinc and NAD⁺-dependent histone deacetylases. *Anal. Biochem.* **2003**, 319, 42-48.
- [153] Vulpetti, A., Bosotti, R.: Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il Farmaco* **2004**, 59, 759-765.
- [154] Rae, J. M., Creighton, C. J., Meck, J. M., Haddad, B. R., Johnson, M. D.: MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells - A loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res. Tr.* **2007**, 104, 13-19.
- [155] Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: *Purification of laboratory chemicals*. 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, 361 und 370.
- [156] Wieking, K.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Paullonen. *Dissertation Universität Hamburg* **2001**.
- [157] Bremner, J. B., Sengpracha, W.: An iodoacetamide-based free radical cyclisation approach to the 7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one (paullone) system. *Tetrahedron* **2005**, 61, 5489-5498.
- [158] Balasubramaniyan, V., Argade, N.: Reactions of cyclic anhydrides: Part XIII - Facile synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro-10*H*-pyridazino[6,1-*b*]quinazoline-2,10-diones. *Indian. J. Chem.* **1988**, 27B, 906-908.
- [159] Gottwald, W.: *Statistik für Anwender*. 1. Aufl., **2000**, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 43-48.
- [160] Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.-G., Moulineaux, J.-P.: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 527-536.
- [161] Primot, A., Baratte, B., Gompel, M., Borgne, A., Liabeuf, S., Romette, J.-L., Jho, E.-h., Costantini, F., Meijer, L.: Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin. *Protein Expr. Purif.* **2000**, 20, 394-404.

- [162] Reinhardt, J., Ferandin, Y., Meijer, L.: Purification of CK1 by affinity chromatography on immobilised axin. *Protein Expr. Purif.* **2007**, 54, 101-109.
- [163] Lacroix, M.: Persistent use of "false" cell lines. *Int. J. Cancer* **2008**, 122, 1-4.

Danksagung

Für die Durchführung der biologischen Testungen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. L. Meijer von der Station Biologique de Roscoff und seinen Mitarbeitern, bei Herrn Prof. Dr. M. Jung und Jörg Schemies vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg und bei den Mitarbeitern des National Cancer Institutes, Bethesda, MD, USA.

Dankbar bin ich Herrn Dr. L. Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für diverse interessante fachliche Diskussionen und seine Unterstützung bei der Literaturrecherche und der Auswertung von NMR-Spektren.

Ich danke Herrn Prof. Dr. L. Ernst, Frau Dr. K. Ibrom sowie Frau P. Holba-Schulz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Aufnahme der NMR-Spektren. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. U. Papke, Herrn Dr. T. Beuerle, Frau D. Döring und Frau C. Mlynek, Massenspektrometrie-Laboratorium der TU Braunschweig, für die Erstellung der Massenspektren danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Beuerle außerdem für die Durchführung der LC-MS-Messungen.

Den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Frau B. Babic, Frau S. Meyer und Frau P. Reich, gilt mein Dank für die Anfertigung der FT-IR-Spektren und Elementaranalysen sowie für die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Bei den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn E. Hinz, Herrn F. Roese und Herrn M. Söchtig möchte ich mich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten und ihre technische Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner wissenschaftlichen Hilfskraft Frau A. Lader für ihre engagierte und gewissenhafte Mitarbeit in meinem Labor, vor allem bei der Durchführung der Malatdehydrogenasetestungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die kollegiale und erfolgreiche Zusammenarbeit und die schöne Zeit in Braunschweig bedanken. Insbesondere gilt mein Dank den Mitgliedern des Arbeitskreises Frau Dr. A.-M. Egert-Schmidt, Frau W. Brandt, Frau S. Lütge, Frau N. Tolle, Frau J. Ryczak, Frau R. Determann und den ehemaligen Mitgliedern Frau Dr. S. Kohfeld, Herrn Dr. C. Prühs, Frau Dr. U. Dunkel, Frau Dr. B. Berger, Herrn Dr. H. Stukenbrock und Frau Dr. C. Reichwald, sowie Herrn Dr. S. Rohrer und Frau C. Anthes aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. K. Baumann.

Bei Frau Dr. C. Reichwald möchte ich mich besonders für die Bereitstellung einiger synthetischer Ausgangsverbindungen bedanken.

Ich danke Herrn Dr. C. Enge, Frau W. Brandt, Frau U. Schmid, Herrn S. Kühne und Frau R. Determann, mit denen ich gemeinsam das Praktikum „Chemie einschließlich der Analytik der organischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“ des 3. Semesters betreut habe.

Für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen danke ich Frau S. Lütge.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Name	Anja Christine Becker
Geboren am	19. Juni 1981
Geburtsort	Berlin-Zehlendorf
1987 - 1991	Grundschule Harksheide-Nord, Norderstedt
1991 - 2000	Lessing-Gymnasium, Norderstedt
06/2000	Allgemeine deutsche Hochschulreife
10/2000 - 07/2004	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
11/2004 – 04/2005	Erste Hälfte des Praktischen Jahres in der Tal-Apotheke, Schriesheim (Inh. Herr Oliver Teichmann)
05/2005 – 10/2005	Zweite Hälfte des Praktischen Jahres bei der Beiersdorf AG, Hamburg
12/2005	Approbation als Apothekerin
seit 01/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Conrad Kunick
03/2009	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik